



CD81 et microdomaines enrichis en tétraspanines :rôle dans l'infection des hépatocytes par Plasmodium.

Olivier Silvie

► To cite this version:

Olivier Silvie. CD81 et microdomaines enrichis en tétraspanines :rôle dans l'infection des hépatocytes par Plasmodium.. Biologie cellulaire. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2006. Français. NNT: . tel-00011596

HAL Id: tel-00011596

<https://theses.hal.science/tel-00011596>

Submitted on 13 Feb 2006

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UFR de Biologie
4 place Jussieu
75005 Paris

Inserm U511
91 Bd de l'hôpital
75013 Paris

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS 6)

Ecole doctorale Biochimie et Biologie Moléculaire
Spécialité Parasitologie

Présentée par

Olivier SILVIE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 6

**CD81 et microdomaines enrichis en tétraspanines :
rôle dans l'infection des hépatocytes par *Plasmodium*.**

Soutenue le 26 janvier 2006

Devant le jury composé de

Pr. Vincent MARECHAL
Dr. Jean-François DUBREMETZ
Dr. Jean DUBUISSON
Dr. Hélène CONJEAUD
Dr. Robert MENARD
Dr Eric RUBINSTEIN
Pr. Dominique MAZIER

Président du jury
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Invité
Directeur de thèse

Principales abréviations utilisées

ADAM : a disintegrin and metalloproteinase
AMA-1 : apical membrane antigen 1
CSP : circumsporozoite protein
CTRP : circumsporozoite- and TRAP-related protein
DAPI : 4,6-diamidino-2-phenylindole
EBA-175 : erythrocyte binding antigen-175
EC : extracellulaire
EEF : exoerythrocytic form (forme exo-érythrocytaire)
EGF : epidermal growth factor
EXP-1 : exported protein-1
FPRP : prostaglandin F2 alpha receptor associated protein
GAG : glycosaminoglycan
GPI : glycosylphosphatidylinositol
GST : glutathione S-transferase
HB-EGF : heparin-binding EGF-like growth factor
HDL : high density lipoprotein
HGF : hepatocyte growth factor
HSP : heat shock protein
HSPG : heparan sulfate proteoglycan
HTLV : human T-cell leukemia virus
ICAM : intercellular adhesion molecule
LDL : low density lipoprotein
LRP : LDL-receptor-related protein
M β CD : methyl beta cyclodextrin
MIDAS : metal ion-dependent adhesion site
MSP-1 : merozoite surface protein-1
MTIP : Myosin A tail domain interacting protein
EMP-1 : erythrocyte membrane protein-1
PGRL : prostaglandin regulatory-like protein
siRNA : small interfering RNA
SPECT : sporozoite microneme protein essential for cell traversal
SRB-1 : scavenger receptor B1
TGF : tumor growth factor
TRAP : thrombospondin-related adhesive protein
TSR : thrombospondin repeat
UIS : up-regulated in sporozoites
UP : uroplakin
VCAM : vascular cell adhesion molecule
VHC : virus de l'hépatite C
VHCpp : pseudoparticules du VHC
VIH : virus de l'immunodéficience humaine

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	4
I. <i>PLASMODIUM</i> ET PALUDISME.....	5
I.1. GENERALITES.....	5
I.2. CYCLE DE VIE DE <i>PLASMODIUM</i>	6
I.3. ASPECTS EPIDEMIOLOGIQUES.....	7
I.4. ASPECTS CLINIQUES.....	8
I.5. APPROCHES VACCINALES.....	9
II. BIOLOGIE DES SPOROZOÏTES.....	11
II.1. GENERALITES SUR LES SPOROZOÏTES.....	11
II.1.1. <i>Structure des sporozoïtes</i>	11
II.1.2. <i>Protéines des sporozoïtes</i>	12
II.3. MOTILITE ET INVASION DES CELLULES CIBLES CHEZ LES <i>APICOMPLEXA</i>	15
II.3.1. <i>La motilité par glissement</i>	15
II.3.2. <i>La machinerie moléculaire de la motilité par glissement</i>	16
II.3.3. <i>Invasion des cellules</i>	20
II.4. LES SPOROZOÏTES DANS LE MOUSTIQUE.....	23
II.4.1. <i>Invasion des glandes salivaires</i>	23
II.4.2. <i>Différenciation des sporozoïtes de glandes salivaires</i>	25
II.5. DU MOUSTIQUE AU FOIE.....	26
II.5.1. <i>Les sporozoïtes dans la peau</i>	26
II.5.2. <i>Séquestration hépatique</i>	27
II.5.3. <i>Passage de la barrière sinusoïdale</i>	29
II.6. INFECTION DES HEPATOCYTES.....	31
II.6.1. <i>Migration avant infection</i>	31
II.6.2. <i>Ligands parasitaires et récepteurs hépatocytaires</i>	33
II.6.3. <i>Développement des formes exo-érythrocytaires</i>	36
II.7. MODELES D'ETUDE DE LA PHASE HEPATIQUE.....	37
III. LES TETRASPANINES.....	40
III.1. STRUCTURE DES TETRASPANINES.....	40
III.2. EXPRESSION TISSULAIRE ET LOCALISATION SUBCELLULAIRE.....	44
III.3. MICRODOMAINES ENRICHIS EN TETRASPANINES.....	45
III.3.1. <i>Partenaires moléculaires des tétraspanines</i>	47
III.3.2. <i>Microdomaines enrichis en tétraspanines</i>	48
III.4. FONCTION DES TETRASPANINES.....	50
III.4.1. <i>Rôle des tétraspanines dans la fonction de leurs partenaires</i>	51
III.4.2. <i>Tétraspanines et remaniements membranaires</i>	53
III.4.3. <i>Ligands des tétraspanines</i>	54
III.5. TETRASPANINES ET INFECTIONS.....	55

<i>III.5.1. CD81 et virus de l'hépatite C</i>	55
<i>III.5.2. Autres infections</i>	58

RESULTATS 60

ROLE DE CD81 AU COURS DE L'INFECTION PAR <i>PLASMODIUM</i>	62
ROLE DES MICRODOMAINES ENRICHIS EN TETRASPANINES AU COURS DE L'INFECTION PAR LES SPOROZOÏTES DE <i>PLASMODIUM</i>	71
ROLE DES PARTENAIRES MOLECULAIRES DE CD81 AU COURS DE L'INFECTION PAR LES SPOROZOÏTES DE <i>PLASMODIUM</i>	74

DISCUSSION 77

I. IMPLICATION DE CD81 AU COURS DE L'INFECTION PAR LES SPOROZOÏTES DE *PLASMODIUM* 78

I.1. LE ROLE DE CD81 DEPEND DE L'ESPECE PLASMODIALE ET DU TYPE DE CELLULES HOTES	78
I.2. ETAPES DE L'INFECTION METTANT EN JEU CD81	81
I.3. MECANISMES IMPLIQUES : HYPOTHESES	84
<i>I.3.1. CD81 est-il un récepteur pour les sporozoïtes ?</i>	84
<i>I.3.2. Hypothèse d'une molécule associée à CD81</i>	86
<i>I.3.3. Autres mécanismes possibles</i>	88

II. MICRODOMAINES ENRICHIS EN TETRASPANINES 90

II.1. DEVELOPPEMENT D'UN NOUVEL OUTIL POUR L'ETUDE DES MICRODOMAINES ENRICHIS EN TETRASPANINES.....	90
II.2. ROLE DU CHOLESTEROL DANS L'ORGANISATION DES MICRODOMAINES ENRICHIS EN TETRASPANINES.....	91
II.3. ROLE DES MICRODOMAINES ENRICHIS EN TETRASPANINES AU COURS DE L'INFECTION PAR LES SPOROZOÏTES DE <i>PLASMODIUM</i>	94

III. CONCLUSION ET PERSPECTIVES 98

REFERENCES 101

ARTICLES 133

Résumé

L'infection des hépatocytes par les sporozoïtes constitue une première étape obligatoire du cycle de *Plasmodium* chez l'hôte vertébré. Les mécanismes impliqués dans l'invasion des hépatocytes restent mal caractérisés. Nous avons découvert que CD81, une protéine transmembranaire appartenant à la famille des tétraspanines, est nécessaire à l'infection des hépatocytes par les sporozoïtes de *Plasmodium falciparum*, de *Plasmodium yoelii*, et dans certains cas de *Plasmodium berghei*. L'expression de CD81 suffit à rendre les cellules hépatocytaires HepG2 sensibles à l'infection par les sporozoïtes de *P. yoelii* mais pas *P. falciparum*, suggérant l'intervention d'autres molécules pour ce parasite. Une caractéristique majeure des tétraspanines est leur capacité de s'associer entre elles et avec d'autres molécules de surface pour former des microdomaines membranaires distincts des radeaux lipidiques classiques (« rafts »). Nos résultats montrent que le cholestérol membranaire contribue non seulement à la localisation de CD81 dans les microdomaines enrichis en tétraspanines mais aussi à l'infection par les sporozoïtes de *Plasmodium* lorsqu'elle implique une voie dépendante de CD81. Nous n'avons pas pu mettre en évidence d'interaction directe entre CD81 et les sporozoïtes, ce qui suggère que CD81 pourrait ne pas jouer un rôle de récepteur pour le parasite mais intervenir de manière indirecte. EWI-F et EWI-2, deux protéines transmembranaires associées à CD81 dans les hépatocytes, ne sont pas directement impliquées dans l'infection par les sporozoïtes. Au contraire, EWI-F a un effet inhibiteur sur l'infection, peut-être lié à une réorganisation des microdomaines à tétraspanines ou à une compétition avec un autre partenaire de CD81. Une autre molécule associée à CD81 pourrait donc jouer un rôle essentiel dans l'infection par les sporozoïtes, éventuellement comme récepteur, mais sa nature reste à déterminer.

Summary

Infection of hepatocytes by *Plasmodium* sporozoites is a prerequisite for initiation of malaria. Still, the molecular mechanisms involved during sporozoite invasion remain poorly characterized. We found that CD81, a host membrane protein belonging to the tetraspanin superfamily, is required for infection of hepatocytes by *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium yoelii* and in certain circumstances *Plasmodium berghei* sporozoites. Expression of CD81 in human hepatocarcinoma HepG2 cells is sufficient to confer susceptibility to *P. yoelii* but not *P. falciparum* sporozoites, suggesting that other molecules are specifically required for infection by the human parasite. Tetraspanins associate extensively with one another and with other membrane proteins to form specific membrane microdomains, called tetraspanin-enriched microdomains, which are distinct from conventional lipid rafts. Our results demonstrate that membrane cholesterol contributes not only to the localization of CD81 into tetraspanin-enriched microdomains but also to CD81-dependent infection by *Plasmodium* sporozoites. So far, we found no evidence for a direct interaction between CD81 and sporozoites, suggesting that CD81 does not act as a receptor for the parasite but is rather involved indirectly. EWI-F and EWI-2, two membrane proteins associated with CD81 in hepatocytes, are not directly involved during sporozoite infection. On the contrary, expression of EWI-F has a negative effect on infection, which could result from a reorganization of tetraspanin-enriched microdomains or from a competition with another CD81 partner. A still unidentified molecule associated with CD81 may thus play an essential role during infection by *Plasmodium* sporozoites, possibly by acting as a receptor.

INTRODUCTION

I. *Plasmodium* et paludisme

I.1. Généralités

Le paludisme est dû à l'infection par un protozoaire du genre *Plasmodium*, transmis par un moustique femelle du genre *Anopheles*. *Plasmodium* appartient au phylum des *Apicomplexa*, qui comporte d'autres agents pathogènes pour l'homme, dont *Toxoplasma gondii*, peu pathogène chez le sujet sain mais responsable de malformations sévères chez le fœtus ou d'encéphalite chez le sujet immunodéprimé, et *Cryptosporidium*, responsable de diarrhées. D'autres apicomplexes tels que *Eimeria*, *Babesia* et *Theileria* sont des pathogènes majeurs en médecine vétérinaire.

Les *Apicomplexa* sont caractérisés par la présence d'une structure juxtanucléaire apparentée au chloroplaste et appelée apicoplaste, d'un anneau polaire apical servant de centre organisateur des microtubules, et d'un ensemble de vésicules formant le complexe apical (micronèmes, rhoptries et granules denses), qui sécrètent leur contenu de manière séquentielle lors de l'invasion des cellules hôtes (Preiser *et al.*, 2000; Morrissette and Sibley, 2002). Le genre *Plasmodium* comporte plus de 100 espèces, dont quatre infectent l'homme : *Plasmodium falciparum*, la principale espèce pathogène pour l'homme, *P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae*. D'autres espèces plasmodiales qui infectent les singes (par exemple *P. knowlesi*, *P. cynomolgi*...) ou les rongeurs (*P. yoelii*, *P. berghei*, *P. chabaudi*, *P. vinckei*...) sont étudiées comme modèles expérimentaux. Des cas de paludisme ont été décrits chez l'homme avec des espèces plasmodiales de singe, notamment *P. knowlesi* (Jongwutiwes *et al.*, 2004).

Le génome nucléaire de *P. falciparum* (souche 3D7), comprend 22,8 millions de paires de bases, réparties sur 14 chromosomes (Gardner *et al.*, 2002). La composition en bases est largement dominée par les adénines et les thymines, qui représentent près de 80 % des bases du génome. Environ **5300 gènes codant des protéines** ont été identifiés chez *P. falciparum*. Plus de 60 % de ces protéines n'ont pas de similarité suffisante dans leur séquence primaire avec des protéines d'autres organismes pour qu'il soit possible de leur assigner une fonction.

I.2. Cycle de vie de *Plasmodium*

Le cycle de *Plasmodium* est complexe (**Figure 1**). Il implique deux hôtes, un moustique femelle de genre *Anopheles* et un hôte vertébré (par exemple l'homme), et comporte trois phases successives de multiplication, deux phases de schizogonie (multiplication asexuée) chez l'hôte vertébré, intra-hépatocytaire puis intra-érythrocytaire, et une phase de sporogonie (multiplication sexuée) chez le moustique. L'hôte vertébré est infecté lors d'une piqûre par un anophèle femelle, qui lui injecte le parasite sous forme de sporozoïtes. Les sporozoïtes migrent rapidement, via la circulation sanguine, vers le foie. Ils pénètrent dans les hépatocytes, où ils se différencient en schizontes hépatiques, sièges d'une multiplication parasitaire intense (Baldacci and Menard, 2004; Kappe *et al.*, 2004). Chaque schizonte donne naissance, en quelques jours, à des dizaines de milliers de nouveaux parasites, les mérozoïtes. Libérés dans le sang, les mérozoïtes pénètrent et se multiplient dans les globules rouges, pour former de nouveaux mérozoïtes qui infectent de nouveaux globules rouges, entretenant ainsi le cycle érythrocytaire. En parallèle, des cellules à potentiel sexué, mâles et femelles (gamétocytes) se forment dans le sang du sujet infecté. Ingérés par un moustique à l'occasion d'une piqûre, les gamétocytes se transforment en gamètes, dont la fécondation engendre la formation d'un ookinète, qui traverse la paroi du tube digestif du moustique avant de se différencier en oocyste où seront formés de nouveaux sporozoïtes. Ces sporozoïtes gagnent les glandes salivaires du moustique, d'où ils peuvent être transmis à un nouvel hôte vertébré à l'occasion d'une piqûre.

Le cycle de *Plasmodium* comporte donc trois stades invasifs : les **ookinètes**, qui traversent les cellules intestinales du moustique, les **sporozoïtes**, qui infectent les glandes salivaires chez le moustique et les hépatocytes chez l'hôte vertébré, et les **mérozoïtes**, qui infectent les globules rouges chez l'hôte vertébré. Les sporozoïtes et les stades intrahépatiques sont appelés stades pré-érythrocytaires. La phase hépatique est asymptomatique chez l'homme, et dure environ 1 semaine dans le cas de *P. falciparum*. Les signes cliniques, parfois graves, surviennent lors de la phase érythrocytaire. Presque tous les médicaments antipaludiques actuellement disponibles sont actifs sur les stades érythrocytaires uniquement.

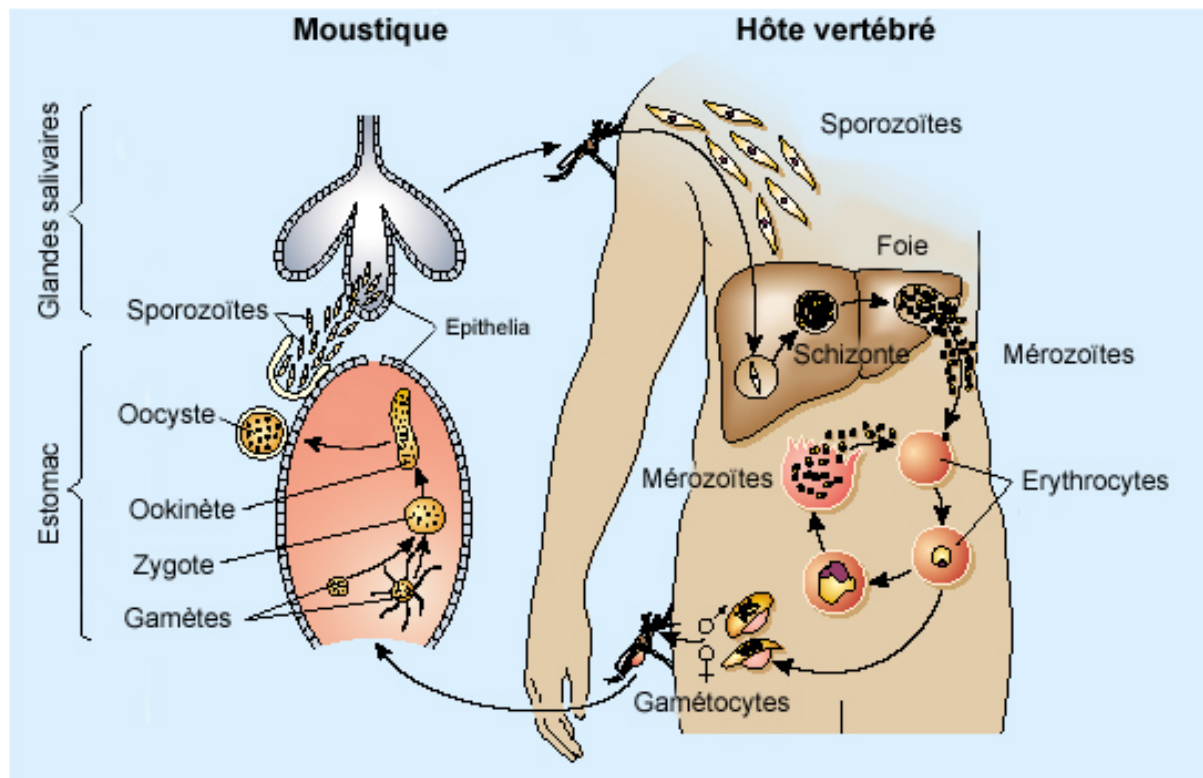


Figure 1. Cycle de vie de *Plasmodium*, d'après (Lycett and Kafatos, 2002).

I.3. Aspects épidémiologiques

Le paludisme reste la maladie parasitaire la plus fréquente au monde : environ 40% de la population mondiale est exposée au parasite, et l'on recense entre 350 et 500 millions de cas par an (infections nouvelles ou ré-infections), dont près de 80% en Afrique subsaharienne (WHO World Malaria Report 2005). Il s'agit d'une des plus meurtrières de toutes les affections humaines : elle tue chaque année 1,5 à 2,7 millions de personnes. Près de 60% des cas et plus de 80% des morts par paludisme ont lieu en Afrique sub-saharienne, touchant majoritairement des enfants de moins de 5 ans; les femmes enceintes aussi sont particulièrement vulnérables face au paludisme. Tous les pays non endémiques d'Europe présentent un paludisme d'importation.

I.4. Aspects cliniques

Les manifestations cliniques du paludisme sont très diverses dans leur expression et dans leur gravité, notamment selon l'espèce plasmodiale en cause. *P. falciparum* est l'espèce la plus pathogène. Il est susceptible d'entraîner la mort en se multipliant dans les microvaisseaux de certains organes profonds (cerveau, reins, poumons). Les accès "simples" (sans complications) peuvent s'exprimer tantôt par des accès de primo-invasion peu spécifiques, qui surviennent chez des sujets non immunisés et qui associent une fièvre en plateau à des douleurs abdominales, tantôt par des accès périodiques plus typiques, qui se caractérisent par trois phases successives de frissons, fièvre supérieure à 39°C et sueurs, et qui peuvent se répéter tous les trois jours (c'est la "fièvre tierce"). Un diagnostic précoce permet alors d'instituer un traitement et d'éviter l'évolution vers un paludisme grave. Les trois complications majeures d'un accès à *P. falciparum* sont l'anémie grave, un syndrome de détresse respiratoire et le neuropaludisme. L'anémie grave est la cause principale de mortalité palustre en région de transmission constante. Elle est causée par la corrélation de deux événements: d'une part la destruction des érythrocytes, en partie par le parasite, et d'autre part la réduction de la production d'érythrocytes durant l'infection (Mackintosh *et al.*, 2004). La détresse respiratoire est liée à la survenue d'un œdème respiratoire chez l'adulte ou d'une acidose métabolique chez l'enfant. Elle représente près de 15 % de la mortalité palustre chez l'enfant (Marsh *et al.*, 1995). Le neuropaludisme consiste en une encéphalopathie diffuse se traduisant par un syndrome neurologique qui conduit généralement à un coma voire à la mort. La pathogenèse du neuropaludisme implique notamment la séquestration des globules rouges parasités dans les capillaires cérébraux, ainsi que les réponses immunitaires de l'hôte (Mackintosh *et al.*, 2004; Pino *et al.*, 2005). Le neuropaludisme touche principalement les enfants en Afrique et les adultes en Asie. Sa mortalité est d'environ 15 % chez l'enfant et 20 % chez l'adulte. En cas de survie, il peut entraîner des séquelles neurologiques (Dugbartey *et al.*, 1998). En absence de traitement, tout accès simple peut évoluer rapidement vers une forme grave, surtout chez les sujets à risque : jeunes enfants, femmes enceintes et voyageurs non immuns avec une prophylaxie déficiente. En zone endémique, environ 1% des enfants infectés entre l'âge de 1 et 4 ans développent une pathologie grave et souvent mortelle. Dans les régions où le paludisme est endémique, les individus finissent par développer une immunité prévenant les manifestations cliniques sévères du paludisme, généralement après

plusieurs années d'infection chronique. Cet état de prémunition peut disparaître en cas de séjour prolongé hors des zones d'endémie.

Les trois autres espèces (*P. vivax*, *P. ovale* et *P. malariae*) provoquent des accès fébriles comparables à ceux qu'entraîne *P. falciparum*, mais dans le cas de *P. malariae* la fièvre survient tous les 4 jours ("fièvre quarte"). Avec ces trois espèces, contrairement à ce qui peut se produire avec *P. falciparum*, les accès simples n'évoluent pas vers des formes graves. En revanche, des rechutes tardives sont possibles, dues à l'existence de formes latentes du parasite chez le sujet infecté (hypnozoïtes hépatiques de *P. vivax* et vraisemblablement de *P. ovale*). Ces rechutes peuvent avoir lieu 4 à 5 ans après l'accès initial avec *P. vivax* et *P. ovale* (parfois même, des accès tardifs apparaissent sans qu'il y ait eu de crise initiale), et jusqu'à 20 ans plus tard avec *P. malariae*.

I.5. Approches vaccinales

A l'heure actuelle, il n'existe aucun vaccin disponible permettant de prévenir le paludisme. Quatre approches vaccinales sont développées dans le cadre de la mise au point d'un vaccin anti-palustre (Miller and Hoffman, 1998). Une première approche consiste à cibler la phase pré-érythrocytaire, pour prévenir à la fois la maladie, par interruption du cycle parasitaire au niveau du foie, et la transmission au moustique, qui se fait lors de la phase érythrocytaire. Ce type de vaccin est destiné à induire soit des réponses anticorps dirigées contre des protéines de surface des sporozoïtes, pour inhiber leur pénétration dans les hépatocytes, soit des réponses cellulaires T dirigées contre les hépatocytes infectés (Mazier, 1991; Hoffman and Doolan, 2000). L'espoir de mettre un jour au point un vaccin pré-érythrocytaire efficace est né du modèle de protection par sporozoïtes irradiés. L'inoculation de sporozoïtes irradiés permet en effet d'obtenir une protection complète contre une infection plasmodiale chez la souris (Nussenzweig *et al.*, 1967), le singe (Collins and Contacos, 1972) et l'homme (Clyde *et al.*, 1973). L'irradiation n'altère pas la capacité d'invasion des sporozoïtes, mais entraîne un blocage du développement des formes intra-hépatiques (Suhrbier *et al.*, 1990; Silvie *et al.*, 2002). Trois études récentes ont démontré que l'immunisation par sporozoïtes génétiquement atténués permet d'induire une protection comparable à celle induite par les sporozoïtes irradiés (Mueller *et al.*, 2005b; Mueller *et al.*, 2005a; van Dijk *et al.*, 2005). Le principal candidat vaccin actuellement en cours de

développement, appelé RTS,S, est constitué d'un fragment de la circumsporozoite protein (CSP), la protéine majeure de la surface des sporozoïtes, inséré dans des particules composées de l'antigène S du virus de l'hépatite B. L'efficacité de ce vaccin n'est que partielle (Bojang *et al.*, 2001; Alonso *et al.*, 2004; Alonso *et al.*, 2005).

Une deuxième approche consiste à limiter la multiplication des stades érythrocytaires du parasite, pour diminuer la morbidité et la mortalité associées à l'infection par *Plasmodium* (Good, 2001). Ce type d'approche vise à induire des réponses anticorps neutralisantes pour empêcher l'infection des globules rouges par les mérozoïtes, ainsi que des réponses de type ADCI (antibody-dependent cellular inhibition) (Bouharoun-Tayoun *et al.*, 1990; Druilhe *et al.*, 2005). Une troisième approche consiste à limiter les complications liées à la multiplication érythrocytaire du parasite, en induisant des réponses anticorps empêchant la cytoadhérence des globules rouges parasités à l'endothélium des microvaisseaux, ou encore l'action de toxines parasitaires (Schofield, 2002; Schofield *et al.*, 2002). Enfin, une quatrième approche consiste à bloquer la transmission au moustique en induisant chez les personnes vaccinées des réponses anticorps dirigées contre des protéines essentielles aux premiers stades du développement parasitaire chez le moustique (Carter *et al.*, 2000). Ces anticorps sont transmis au moustique en même temps que les gamétocytes, à l'occasion d'un repas sanguin de l'anophèle. Ce type d'approche ne vise pas à protéger le sujet vacciné mais à empêcher l'infection de l'entourage. Il s'agit donc de vaccins altruistes.

Ces différents types d'approche sont également combinés au sein de stratégies vaccinales dirigées contre plusieurs stades du développement parasitaire, selon l'idée que seul un vaccin multivalent « multi-stades » pourra être efficace contre un parasite aussi complexe que *Plasmodium* (Hoffman *et al.*, 1998).

II. Biologie des sporozoïtes

II.1. Généralités sur les sporozoïtes

Les sporozoïtes représentent un stade particulier du cycle de *Plasmodium* car ils interagissent avec les deux hôtes du parasite. Chez le moustique, les sporozoïtes sont formés dans les oocystes au niveau de la paroi du tube digestif, puis infectent les glandes salivaires. Une fois injectés chez l'hôte mammifère, ils gagnent le foie et infectent les hépatocytes.

II.1.1. Structure des sporozoïtes

Les sporozoïtes sont des cellules polarisées allongées (**Figure 2**), mesurant environ 10 μm de long et 1 μm de large. La forme des sporozoïtes est maintenue par des microtubules ancrés à l'anneau polaire antérieur et disposés longitudinalement sous la triple membrane pelliculaire, constituée de la membrane plasmique sous laquelle est apposé un ensemble de larges vésicules aplaties appelées complexe membranaire interne. Les sporozoïtes possèdent les structures caractéristiques des *Apicomplexa* : un apicoplaste et des vésicules sécrétoires localisées au pôle antérieur du parasite, les rhoptries (deux vésicules allongées en club de golf) et les micronèmes (vésicules arrondies).

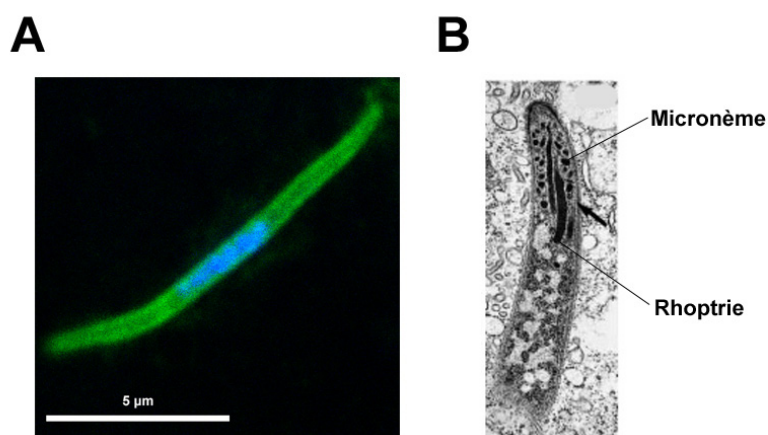


Figure 2. A. Sporozoïte de *P. yoelii* isolé des glandes salivaires d'un moustique infecté, marqué par anticorps anti-circumsporozoïte protéin (CSP, en vert) et DAPI (noyau marqué en bleu) et observé en microscopie à fluorescence (photo O. Silvie). B. Extrémité apicale d'un sporozoïte observée en microscopie électronique (Menard, 2001). Deux types de vésicules sécrétoires sont visibles : deux vésicules allongées, les rhoptries, et des vésicules arrondies, les micronèmes.

II.1.2. Protéines des sporozoïtes

Jusqu'à récemment, les principales protéines caractérisées chez les sporozoïtes étaient la circumsporozoite protein (CSP) et la thrombospondin-related adhesive protein (TRAP), deux protéines présentes à la surface des sporozoïtes et contenant des motifs adhésifs typiques impliqués dans des interactions ligand-récepteur chez les mammifères (Menard, 2000; Baldacci and Menard, 2004; Kappe *et al.*, 2004).

La CSP est exprimée essentiellement au stade sporozoïte chez *Plasmodium*, et n'est pas retrouvée chez les autres *Apicomplexa*. C'est une protéine majeure qui couvre la surface du sporozoïte (Yoshida *et al.*, 1981; Nussenzweig and Nussenzweig, 1985). Elle est également présente dans les micronèmes (Posthuma *et al.*, 1989) d'où elle est continuellement sécrétée à la surface du sporozoïte et relarguée au pôle postérieur lorsque le sporozoïte se déplace (Stewart and Vanderberg, 1991). A l'heure actuelle, la CSP constitue le principal candidat vaccinal pré-érythrocytaire.

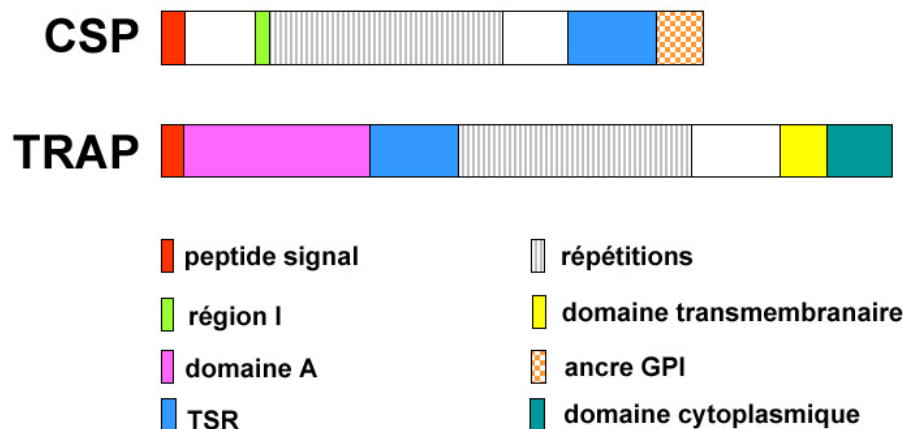


Figure 3. Structure schématique de la circumsporozoite protein (CSP) et de la thrombospondin-related adhesive protein (TRAP), les deux principales protéines caractérisées chez les sporozoïtes de *Plasmodium*.

La structure de la CSP (**Figure 3**) comporte un domaine central fait de répétitions variables d'une espèce plasmodiale à l'autre et contenant des épitopes B immunodominants (Godson *et al.*, 1983). La fonction de ces motifs répétés est inconnue. Ces répétitions sont flanquées de deux régions conservées, la région I et la région II-plus. La région I consiste en un pentapeptide KLKQP impliqué dans l'attachement aux glandes salivaires chez le moustique (Sidjanski *et al.*, 1997). La région II-plus est une séquence de 18 acides aminés

insérée au sein d'un domaine de répétitions de la thrombospondine (thrombospondin repeat, TSR) de type 1. Le TSR est un domaine d'une soixantaine de résidus trouvé chez les membres d'une superfamille de protéines adhésives apparentées à la thrombospondine. Les domaines de type TSR fixent notamment les glycoconjugués sulfatés (Holt *et al.*, 1990). La région II-plus de la CSP est impliquée dans l'adhérence des sporozoïtes aux héparanes sulfate protéoglycanes (HSPG) hépatiques (Cerami *et al.*, 1992; Frevert *et al.*, 1993; Cerami *et al.*, 1994; Sinnis *et al.*, 1994), et est nécessaire à la motilité et à l'infectiosité des sporozoïtes (Tewari *et al.*, 2002). L'extrémité C-terminale de la CSP comprend une séquence canonique d'insertion d'un glycophosphatidyl inositol (GPI) (McCutchan *et al.*, 1996), qui pourrait l'ancrer à la membrane. La suppression de cette séquence et son remplacement par un segment transmembranaire empêche le développement des sporozoïtes dans l'oocyste (Wang *et al.*, 2005).

TRAP est une protéine transmembranaire de type I exprimée au stade sporozoïte de *Plasmodium*, et dont la structure est conservée au sein des différentes espèces plasmodiales (Templeton and Kaslow, 1997). Elle comprend deux motifs adhésifs extracellulaires (un domaine A et un domaine de type TSR), une région de répétitions, un domaine transmembranaire et une courte queue cytoplasmique de séquence conservée (Robson *et al.*, 1988) (**Figure 3**). Les domaines A sont formés d'environ 200 acides aminés, et sont retrouvés dans les chaînes alpha de certaines intégrines, dans le facteur von Willebrand, dans des protéines de matrice extracellulaire dont le collagène, et dans des composants du complément (Whittaker and Hynes, 2002). Les domaines A contiennent un motif de 5 acides aminés appelé MIDAS (metal ion-dependent adhesion site) qui coordine Mg^{2+} ou Mn^{2+} (Michishita *et al.*, 1993). Le motif MIDAS est connu pour moduler les propriétés adhésives des intégrines (Hynes, 2002).

Si la CSP et TRAP représentent les protéines les plus étudiées, il est maintenant clair que de nombreuses autres protéines jouent un rôle essentiel dans l'infectiosité des sporozoïtes (Baldacci and Menard, 2004; Kappe *et al.*, 2004). Avec le séquençage des génomes de *P. falciparum* (Gardner *et al.*, 2002), *P. yoelii* (Carlton *et al.*, 2002) et *P. berghei* (Hall *et al.*, 2005), et grâce à différentes approches de génomique fonctionnelle et de protéomique, le répertoire des protéines exprimées au stade sporozoïte est désormais mieux connu. L'analyse d'une banque d'ADNc de sporozoïtes de *P. yoelii* a permis de mettre en évidence environ 1500 gènes exprimés au stade sporozoïte (Kappe *et al.*, 2001). Les données de puces à ADN

(« DNA microarrays ») ont permis d'identifier environ 2000 gènes pour lesquels des transcrits sont retrouvés au stade sporozoïte chez *P. falciparum*, dont environ 500 sont exprimés à un niveau élevé (Le Roch *et al.*, 2003). Parmi ces gènes, plus de 100 ne sont pas exprimés aux stades sanguins. Une étude protéomique des sporozoïtes de *P. falciparum* (Florens *et al.*, 2002) a permis d'identifier 1049 protéines exprimées au stade sporozoïte, dont 513 n'avaient pas été trouvées dans d'autres stades. Plus récemment, une étude protéomique a permis d'identifier 134 protéines exprimées par les sporozoïtes de *P. berghei*, dont 43 exprimées uniquement à ce stade (Hall *et al.*, 2005). L'analyse fonctionnelle de ces gènes est facilitée par les manipulations génétiques qui autorisent l'inactivation (« knockout ») ou la modification de gènes sans affecter la multiplication des stades sanguins, seuls stades où la sélection de mutants est techniquement possible (Menard and Janse, 1997). Le knockout de plusieurs gènes (essentiellement chez *P. berghei*) a récemment permis d'identifier le rôle essentiel de certaines protéines des sporozoïtes (**Tableau 1**).

Knockout	Localisation	Phénotype des sporozoïtes	Références
CSP	Surface, micronèmes	Défaut de formation des sporozoïtes	(Menard <i>et al.</i> , 1997)
TRAP	Micronèmes, surface	Perte de motilité, défaut d'invasion des glandes salivaires du moustique et des hépatocytes de l'hôte vertébré	(Sultan <i>et al.</i> , 1997b; Mota <i>et al.</i> , 2001a)
MAEBL	Micronèmes, surface	Défaut d'invasion des glandes salivaires du moustique, mais pas des hépatocytes chez l'hôte vertébré	(Kariu <i>et al.</i> , 2002)
UIS10	Micronèmes, surface	Défaut de migration à travers les cellules, sans défaut de motilité ni d'infectiosité pour les hépatocytes	(Bhanot <i>et al.</i> , 2005)
SPECT-1	Micronèmes	Défaut de migration à travers les cellules, sans défaut de motilité ni d'infectiosité pour les hépatocytes	(Ishino <i>et al.</i> , 2004)
SPECT-2	Micronèmes	Défaut de migration à travers les cellules, sans défaut de motilité ni d'infectiosité pour les hépatocytes	(Ishino <i>et al.</i> , 2005a)
P36	?	Perte d'infectiosité pour les hépatocytes	(Ishino <i>et al.</i> , 2005c)
P36p	Micronèmes, surface	Perte d'infectiosité pour les hépatocytes	(Ishino <i>et al.</i> , 2005c; van Dijk <i>et al.</i> , 2005)
UIS3	?	Défaut de développement intrahépatique, sans défaut d'invasion	(Mueller <i>et al.</i> , 2005a)
UIS4	?	Défaut de développement intrahépatique, sans défaut d'invasion	(Mueller <i>et al.</i> , 2005b)

Tableau 1. Effets de l'inactivation de différents gènes sur les sporozoïtes de *Plasmodium*.

Une approche de mutagenèse conditionnelle a récemment été décrite et devrait permettre d'inactiver spécifiquement l'expression de gènes cibles dans les sporozoïtes (Carvalho *et al.*, 2004). Ce type d'approche devrait permettre d'étendre les analyses génétiques chez *Plasmodium* à des gènes nécessaires à la multiplication érythrocytaire du parasite, pour lesquels l'obtention de sporozoïtes mutants était jusqu'à présent impossible.

II.3. Motilité et invasion des cellules cibles chez les *Apicomplexa*

La motilité et l'invasion des cellules reposent sur des mécanismes conservés chez les *Apicomplexa*. La compréhension de ces mécanismes résulte non seulement de l'étude des sporozoïtes de *Plasmodium*, mais aussi de celle d'autres stades de *Plasmodium* ou d'autres parasites, notamment *Toxoplasma gondii*, auxquels nous ferons donc également référence dans ce chapitre.

II.3.1. La motilité par glissement

Les formes invasives des *Apicomplexa*, les zoïtes, sont mobiles. Ces parasites utilisent un mode particulier de motricité appelé motilité par glissement (« gliding motility ») qui leur permet de se déplacer relativement rapidement (1-10 $\mu\text{m/s}$) sur des substrats solides et de pénétrer activement dans les cellules cibles, en quelques secondes. Ces parasites sont dépourvus de cils ou flagelles, et n'étendent pas de pseudopodes. La motilité par glissement se fait sans changement de forme, et repose sur la translocation antéro-postérieure de molécules adhésives de surface couplées à un moteur actine-myosine localisé sous la membrane du parasite (King, 1988; Menard, 2001; Opitz and Soldati, 2002). Très tôt il avait été observé que l'infectiosité des sporozoïtes est liée à la motilité par glissement (Vanderberg, 1974). Il a ensuite été démontré que l'invasion des globules rouges par les mérozoïtes de *Plasmodium* dépend de l'actine et s'accompagne de la translocation vers l'arrière d'une jonction annulaire (Aikawa *et al.*, 1978; Miller *et al.*, 1979). D'autres études ont montré que des particules déposées à la surface des zoïtes se déplacent vers l'arrière à la même vitesse que le glissement (Russell and Sinden, 1981), et les deux processus sont inhibés par les

cytochalasines (King, 1988). De la même façon, les parasites redistribuent des anticorps en surface (Dubremetz *et al.*, 1985; Speer *et al.*, 1985). Ces différentes observations ont conduit au modèle actuellement admis du « capping » de molécules en surface du parasite, activé par un moteur actine-dépendant (Russell and Sinden, 1981; King, 1988).

II.3.2. La machinerie moléculaire de la motilité par glissement

La motilité par glissement repose sur la redistribution antéro-postérieure (« capping ») de molécules adhésives de surface appelées invasines. Ces invasines sont des protéines transmembranaires dont l'extrémité cytoplasmique est connectée à un moteur dépendant de l'actine (Dobrowolski and Sibley, 1996; Wetzel *et al.*, 2003) et d'une myosine (Pinder *et al.*, 1998; Matuschewski *et al.*, 2001; Meissner *et al.*, 2002). La myosine est fixée sur le complexe membranaire interne, alors que l'actine polymérisée (actine F) est apposée à la membrane plasmique et interagit avec la partie cytoplasmique de l'invasine via l'enzyme glycolytique aldolase (Buscaglia *et al.*, 2003; Jewett and Sibley, 2003). Pendant la motilité, le complexe aldolase-invasine serait redistribué le long de filaments d'actine formés localement (Jewett and Sibley, 2003) et propulsés vers l'arrière par les molécules de myosine attachées au complexe membranaire interne (Bergman *et al.*, 2003). Cette machinerie redistribue ainsi les invasines vers l'arrière, et lorsque la partie extracellulaire de ces molécules adhésives est engagée dans des interactions avec un substrat fixe, cela induit un mouvement vers l'avant du parasite (**Figure 4**).

Les myosines identifiées chez les *Apicomplexa* sont particulières, et forment une classe à part, la classe XIV des myosines, spécifique des *Apicomplexa* (Heintzelman and Schwartzman, 1997). L'utilisation de mutants conditionnels a permis de démontrer le rôle de la myosine A dans la motilité et l'invasion de *Toxoplasma* (Meissner *et al.*, 2002). La myosine A identifiée chez *Plasmodium* et *Toxoplasma* est localisée sous la membrane plasmique (Dobrowolski *et al.*, 1997; Pinder *et al.*, 1998; Margos *et al.*, 2000; Bergman *et al.*, 2003). La myosine A associée à la protéine MTIP sont ancrées au complexe membranaire interne par l'intermédiaire des protéines GAP (Glideosome Associated protein)-45 et GAP-50 (Herm-Gotz *et al.*, 2002; Bergman *et al.*, 2003; Gaskins *et al.*, 2004; Baum *et al.*, 2005).

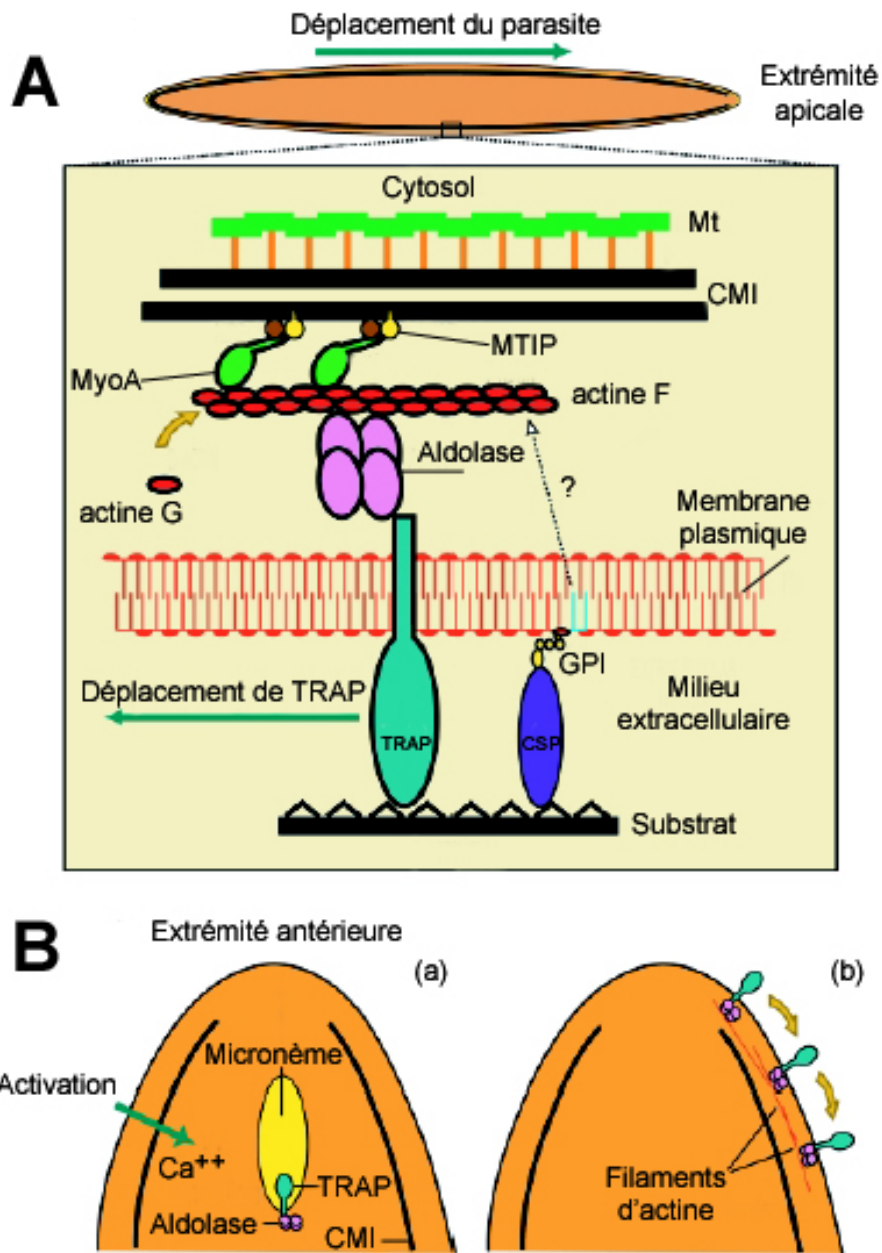


Figure 4. A. Schéma de la machinerie moléculaire impliquée dans la motilité des sporozoïtes de *Plasmodium*. CMI = complexe membranaire interne. Mt = microtubules. D'après (Kappe *et al.*, 2004). B. La sécrétion des micronèmes, induite par des signaux calciques, entraîne le passage de TRAP à la surface du parasite. TRAP se fixe via l'aldolase aux filaments d'actine formés transitoirement sous la membrane plasmique du sporozoïte. La myosine fixée au complexe membranaire interne (CMI) déplace ces filaments d'actine vers l'arrière, ce qui entraîne une redistribution antéro-postérieure de TRAP (« capping »).

Le modèle de la motilité par glissement repose sur la polymérisation de l'actine. Pourtant, l'actine F est à peine détectable dans les zoïtes des *Apicomplexa* (Shaw and Tilney, 1999; Wetzel *et al.*, 2003). L'actine F peut être visualisée dans les tachyzoïtes de *Toxoplasma*

seulement après traitement par jasplakinolide, un agent stabilisant l'actine F (Shaw and Tilney, 1999). L'induction d'une polymérisation massive de l'actine par de fortes doses de cette molécule entraîne une inhibition de la motilité des parasites et de l'invasion des cellules cibles (Shaw and Tilney, 1999). Par contre, à faible dose, le jasplakinolide augmente la vitesse du glissement mais gêne le mouvement du parasite en induisant de fréquents changements de sens du déplacement, associés à une désorganisation des filaments d'actine qui sont alors orientés de façon aléatoire (Wetzel *et al.*, 2003). Ces résultats suggèrent que la polymérisation d'actine est un facteur limitant dans la motilité, et qu'il s'agit d'un processus dynamique et régulé. Des protéines de régulation de l'actine ont été identifiées chez *Plasmodium* et *Toxoplasma* (Allen *et al.*, 1997; Tardieux *et al.*, 1998a; Tardieux *et al.*, 1998b; Poupel *et al.*, 2000; Delorme *et al.*, 2003; Schuler *et al.*, 2005).

Il est maintenant clairement établi que les protéines transmembranaires qui connectent le moteur intraparasitaire au substrat extracellulaire, les invasines, appartiennent à la famille de TRAP (Robson *et al.*, 1988; Rogers *et al.*, 1992). TRAP joue clairement un rôle essentiel dans le processus de « capping » qui permet le glissement des sporozoïtes et l'invasion des cellules hôtes. TRAP est principalement stockée dans les micronèmes (Rogers *et al.*, 1992) et s'accumule au pôle antérieur du parasite après sécrétion du contenu des micronèmes induite notamment par le contact avec les cellules (Gantt *et al.*, 2000). Pendant le déplacement des sporozoïtes, TRAP est détectée à la surface du parasite et est relarguée après clivage protéolytique (Kappe *et al.*, 1999; Silvie *et al.*, 2004). Des études génétiques ont confirmé que TRAP est directement impliquée dans la motilité des sporozoïtes et dans l'invasion des glandes salivaires et des hépatocytes (Sultan *et al.*, 1997b; Wengelnik *et al.*, 1999; Matuschewski *et al.*, 2002a). Les mutants de *P. berghei* et *P. yoelii* déficients en TRAP ne sont plus motiles et sont incapables d'infecter les glandes salivaires chez le moustique ou les hépatocytes chez l'hôte vertébré (Sultan *et al.*, 1997b; Mota *et al.*, 2001a). L'extrémité cytoplasmique de TRAP joue un rôle majeur dans la motilité en permettant la connexion au moteur actine-myosine. Elle forme un complexe avec l'enzyme glycolytique tétramérique aldolase, et ce complexe fixe l'actine F (Buscaglia *et al.*, 2003; Jewett and Sibley, 2003). Il a été montré que les substrats et produits de l'aldolase sont capables d'inhiber l'interaction de l'enzyme avec TRAP, ce qui suggère une possible régulation métabolique de la motilité (Buscaglia *et al.*, 2003). L'association de TRAP à l'aldolase dépend notamment de la

présence d'un tryptophane subterminal conservé. Chez *P. berghei*, la délétion de la queue cytoplasmique de TRAP n'empêche pas l'expression de la protéine à la surface du sporozoïte, mais supprime la motilité et l'infectiosité des sporozoïtes (Kappe *et al.*, 1999).

La famille des invasines apparentées à TRAP comprend CTRP chez les ookinètes de *Plasmodium* (Trottein *et al.*, 1995; Yuda *et al.*, 1999), MIC2 chez *Toxoplasma* (Wan *et al.*, 1997), Etp100 chez *Eimeria* (Tomley *et al.*, 1991; Pasamontes *et al.*, 1993), et TRAPC1 chez *Cryptosporidium* (Spano *et al.*, 1998). Toutes ces protéines sont caractérisées par la présence dans leur partie extracellulaire d'une ou plusieurs copies des deux types de domaines adhésifs (domaine A et domaine TSR), ainsi que par la présence d'une queue cytoplasmique riche en résidus acides et possédant un tryptophane subterminal. Différentes données montrent que ces protéines ont une fonction similaire à celle de TRAP chez le sporozoïte. MIC2 chez *Toxoplasma* passe des micronèmes à la surface du parasite lors de l'attachement aux cellules (Carruthers and Sibley, 1997) et colocalise avec la jonction mobile pendant la pénétration du tachyzoïte (Carruthers *et al.*, 1999). La protéine CTRP chez *Plasmodium*, exprimée au stade ookinète, joue probablement le même rôle. L'inactivation de CTRP chez *P. berghei* (Dessens *et al.*, 1999; Yuda *et al.*, 1999) et *P. falciparum* (Templeton *et al.*, 2000) a montré que CTRP est nécessaire à la transformation de l'ookinète en oocyste, qui nécessite la traversée de l'épithélium de l'estomac du moustique. Les queues cytoplasmiques des invasines de ces différents parasites présentent peu d'homologie de séquence, mais elles sont interchangeable, ce qui démontre une conservation de fonction (Kappe *et al.*, 1999). Bien que n'appartenant pas à la famille de TRAP, la protéine transmembranaire EBA-175 (erythrocyte binding antigen-175) a été initialement suggérée comme paralogue de TRAP chez les mérozoïtes de *Plasmodium*, mais sa queue cytoplasmique est dépourvue du tryptophane subterminal impliqué dans l'interaction avec l'aldolase (Gilberger *et al.*, 2003). Une autre protéine paralogue de TRAP vient d'être décrite chez les mérozoïtes de *P. falciparum*. Cette protéine, nommée MTRAP (pour merozoite TRAP), possède un domaine TSR mais pas de domaine de type A, et sa queue cytoplasmique peut interagir avec l'aldolase (Baum *et al.*, 2005).

Lorsque les sporozoïtes glissent, ils relarguent des fragments de TRAP produits après clivage protéolytique (Kappe *et al.*, 1999; Silvie *et al.*, 2004). De grandes quantités de CSP sont aussi continuellement relarguées au pôle postérieur du parasite pendant ses déplacements (Stewart *et al.*, 1986). La CSP est insérée dans la membrane via une ancre GPI, et donc n'est

pas directement couplée au moteur actine-myosine. Elle est probablement reliée à ce moteur via une autre protéine transmembranaire, vraisemblablement TRAP, bien qu'aucune interaction CSP-TRAP n'ait pu être mise en évidence par co-immunoprécipitation. Dans ce cadre, la délétion de la région II dans le TSR de la CSP induit le même phénotype que l'inactivation de TRAP (immobilité et perte d'infectiosité des sporozoïtes) (Tewari *et al.*, 2002). Cela suggère un potentiel couplage fonctionnel entre CSP et TRAP.

II.3.3. Invasion des cellules

Les premières analyses ultrastructurales détaillées de l'invasion des cellules par les zoïtes ont porté sur l'invasion des érythrocytes par les mérozoïtes de *Plasmodium* (Aikawa *et al.*, 1978; Miller *et al.*, 1979). Ces études ont montré que les mérozoïtes entrent dans les globules rouges via une jonction mobile (« moving junction »). Après contact initial avec les cellules, une jonction étroite se forme entre le pôle apical du zoïte et la surface cellulaire, puis est redistribuée vers l'arrière comme un anneau autour du zoïte qui pénètre progressivement au sein d'une vacuole. Une jonction mobile similaire, parfois visible sous forme d'une constriction autour du parasite, a été observée lors de l'invasion par d'autres *Apicomplexa* (Russell and Sinden, 1981; Dubremetz *et al.*, 1985; Entzeroth, 1985; Chobotar *et al.*, 1993; Pimenta *et al.*, 1994; Morisaki *et al.*, 1995).

L'internalisation ne dure que quelques secondes et ne dépend pas de la polymérisation de l'actine de l'hôte (Dobrowolski and Sibley, 1996). Ce processus diffère donc de l'endocytose permettant l'invasion par certaines bactéries comme *Listeria* ou *Shigella*, au cours de laquelle le cytosquelette de la cellule hôte joue un rôle essentiel (Rottner *et al.*, 2005). Chez les *Apicomplexa*, l'invasion par formation d'une vacuole se fait selon un processus similaire à la motilité par glissement. Des ligands parasitaires sont sécrétés à la surface des parasites à leur pôle antérieur, se fixent sur un substrat ou à la surface d'une cellule cible, et sont redistribués vers l'arrière. La fixation de ces ligands à un substrat fixe entraîne un mouvement du parasite vers l'avant (glissement), alors que la fixation à un récepteur cellulaire entraîne la pénétration du parasite dans la cellule, au sein d'une invagination de la membrane plasmique qui aboutit à la formation de la vacuole parasitaire (**Figure 5**).

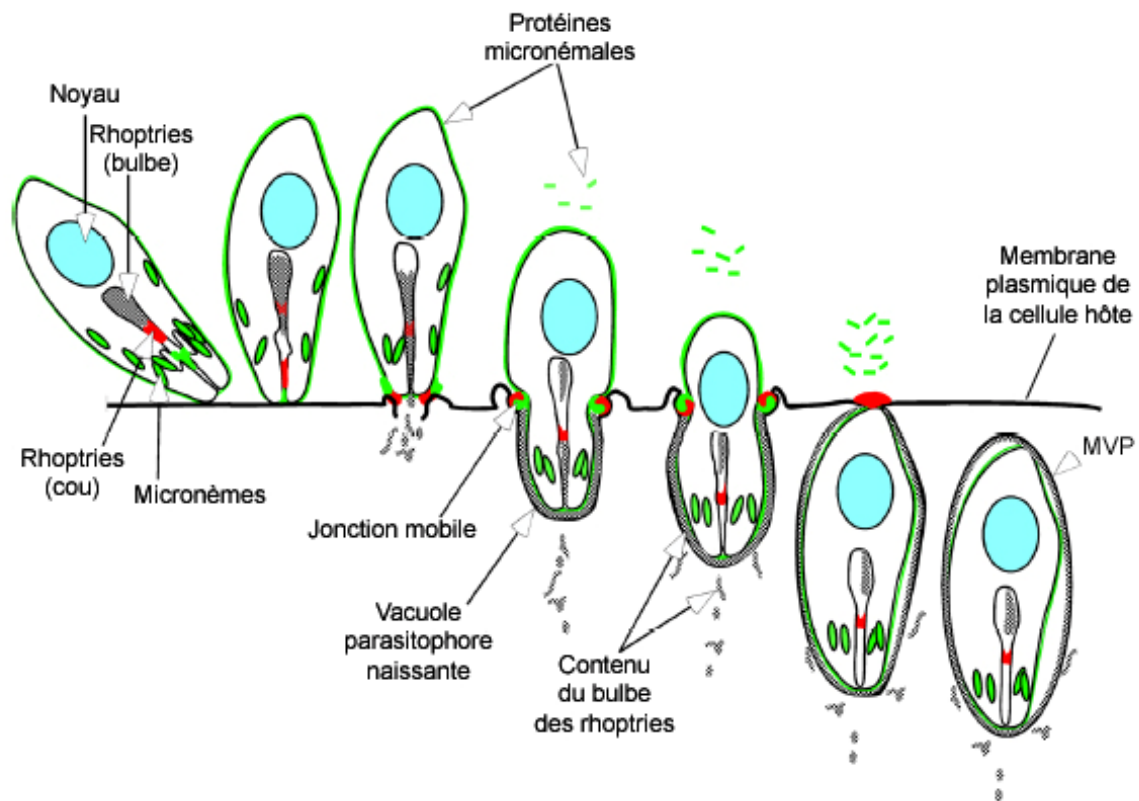


Figure 5. Schéma de l'invasion d'une cellule hôte par un zoïte, d'après (Alexander *et al.*, 2005). Après attachement, le zoïte établit une jonction étroite entre des protéines des micronèmes et du cou des rhoptries et la surface cellulaire. La redistribution antéro-postérieure de cette jonction (« moving junction ») induite activement par la machinerie motrice du parasite propulse le zoïte vers l'avant au sein d'une invagination de la membrane plasmique de la cellule, qui aboutit à la formation de la vacuole parasitophore (VP), entourée de sa membrane (MVP). Lorsqu'elles atteignent le pôle postérieur du zoïte, les protéines redistribuées en surface sont relarguées dans le milieu après clivage protéolytique. La sécrétion du contenu du bulbe des rhoptries participe à la formation de la vacuole pendant l'invasion.

La membrane de la vacuole entoure étroitement le zoïte et se referme à son pôle postérieur une fois qu'il est complètement internalisé (Suss-Toby *et al.*, 1996). L'invasion par formation d'une vacuole parasitophore se fait ainsi sans rupture d'intégrité de la membrane plasmique de la cellule hôte (Suss-Toby *et al.*, 1996; Mota *et al.*, 2001b). Des mesures de capacitance membranaire pendant l'invasion par *Toxoplasma* ont montré que la membrane de la vacuole parasitophore dérive essentiellement de la membrane plasmique de la cellule hôte (Suss-Toby *et al.*, 1996). Une autre étude a par ailleurs montré qu'au cours de la pénétration

des tachyzoïtes de *Toxoplasma*, les protéines transmembranaires de la cellule hôte sont sélectivement exclues de la jonction et ne se retrouvent donc pas sur la membrane de la vacuole parasitophore formée, au contraire des protéines à ancrage GPI, qui elles passent la jonction et sont retrouvées sur la membrane de la vacuole (Mordue *et al.*, 1999). La séparation de la vacuole de la membrane plasmique de la cellule fait intervenir le clivage protéolytique des ligands parasitaires impliqués dans la jonction, et implique des protéases d'origine parasitaire (Blackman, 2000; Blackman, 2004; O'Donnell and Blackman, 2005). La pénétration du parasite aboutit à la formation d'un compartiment non-fusogène, remodelé par incorporation de protéines et lipides sécrétés par le parasite dans la membrane de la vacuole parasitophore (Sinai and Joiner, 1997; Lingelbach and Joiner, 1998).

L'invasion des zoïtes s'accompagne de la sécrétion séquentielle des différentes vésicules du complexe apical. La formation de la jonction sur lequel le moteur exerce sa force coïncide avec l'exocytose des micronèmes, qui sécrètent leur contenu au pôle antérieur du zoïte (Entzeroth *et al.*, 1992; Carruthers and Sibley, 1997; Carruthers *et al.*, 1999). La formation de la membrane de la vacuole coïncide avec la libération du contenu des rhoptries, qui contiennent des lipides et des membranes internes (Sam-Yellowe, 1996; Suss-Toby *et al.*, 1996). Cependant, deux études récentes ont montré que le contenu des rhoptries participe également à la formation de la jonction mobile (voir plus loin) (Alexander *et al.*, 2005; Lebrun *et al.*, In Press). A cet égard, une étude a montré que l'invasion par les tachyzoïtes de *Toxoplasma* est précédée de l'injection dans la cellule cible de matériel membranaire formant des vacuoles vides (« evacuoles »), qui fusionnent ensuite avec la vacuole formée lors de la pénétration du parasite (Hakansson *et al.*, 2001). Ce type de phénomène n'a pas été documenté chez *Plasmodium*.

Si la multiplication du parasite dans la cellule hôte implique la formation d'une vacuole parasitophore, certaines formes invasives des *Apicomplexa* peuvent également pénétrer dans les cellules hôtes directement par effraction de la membrane plasmique de la cellule. Le parasite intracellulaire réside alors libre dans le cytoplasme, et glisse rapidement hors de la cellule, à nouveau en trouant la membrane plasmique de la cellule. Par transcytose active, le parasite peut ainsi migrer à travers plusieurs cellules. C'est le cas notamment des ookinètes de *Plasmodium*, qui traversent les cellules de l'épithélium digestif du moustique (Han *et al.*, 2000; Zieler and Dvorak, 2000). A cet égard, on peut noter que les ookinètes ne forment pas de vacuole parasitophore et n'expriment pas de protéines de rhoptries (Hall *et al.*,

2005). Les sporozoïtes de *Plasmodium* sont également capables de migrer à travers divers types cellulaires *in vitro* (Vanderberg *et al.*, 1990; Mota *et al.*, 2001b), y compris des cellules non hépatocytaires qui ne permettent pas le développement du parasite (Mota *et al.*, 2001b). La migration des sporozoïtes à travers les cellules peut être facilement analysée grâce à l'utilisation de marqueurs macromoléculaires de type dextran couplés à un fluorochrome. Les cellules sont normalement imperméables à ce type de marqueurs, sauf en cas de pénétration d'un sporozoïte par effraction membranaire (Mota *et al.*, 2001b).

II.4. Les sporozoïtes dans le moustique

La formation des sporozoïtes a lieu au sein des oocystes, localisés sous la membrane basale de l'épithélium du tube digestif du moustique. Les oocystes de mutants déficients en CSP ne produisent pas de sporozoïtes (Menard *et al.*, 1997; Thathy *et al.*, 2002). Une autre protéine appelée SR (scavenger receptor) est également nécessaire à la formation des sporozoïtes (Claudianos *et al.*, 2002). Les sporozoïtes sont libérés dans l'hémolymphe, le liquide qui baigne la cavité du corps du moustique. La sortie des sporozoïtes de l'oocyste est un processus actif, qui nécessite notamment l'activité d'une cystéine protéase du parasite (Aly and Matuschewski, 2005). Les sporozoïtes sont ensuite transportés par l'hémolymphe jusqu'aux glandes salivaires.

II.4.1. Invasion des glandes salivaires

Les sporozoïtes atteignent les glandes salivaires probablement par transport passif (Golenda *et al.*, 1990; Rosenberg and Rungsiwongse, 1991; Vaughan *et al.*, 1992). Une étude récente a montré qu'un gradient chimiotactique favorise la colonisation des glandes salivaires par les sporozoïtes (Akaki and Dvorak, 2005). Les sporozoïtes infectent préférentiellement les lobes médian et latéral distal des glandes salivaires, suggérant l'existence de récepteurs spécifiques, encore non identifiés (Sterling *et al.*, 1973). Les sporozoïtes traversent la membrane basale qui couvre les glandes salivaires puis traversent les cellules sécrétoires avant d'atteindre les cavités sécrétoires, où ils demeurent jusqu'à ce qu'ils soient éventuellement transmis à un hôte lors d'une piqure.

Un rôle dans l'infection des glandes salivaires a été démontré pour trois protéines des sporozoïtes, la CSP, TRAP, et MAEBL. La CSP est impliquée dans l'attachement aux glandes salivaires du moustique. Des anticorps anti-CSP injectés dans l'hémolymphe inhibent l'infection des glandes salivaires par les sporozoïtes (Warburg *et al.*, 1992), et la CSP sous forme recombinante se fixe spécifiquement sur les lobes médian et latéral distal des glandes (Sidjanski *et al.*, 1997). De plus, une forme recombinante de la CSP de *P. falciparum* et un peptide dérivé de la région N-terminale de cette protéine inhibent l'invasion des glandes salivaires par les sporozoïtes de *P. yoelii* (Myung *et al.*, 2004). Les sporozoïtes des mutants de *P. berghei* délétés en TRAP sont déficients en motilité et incapables d'infecter les glandes salivaires (Sultan *et al.*, 1997b). Ils peuvent toutefois s'attacher aux glandes salivaires, probablement via la CSP. De manière intéressante, le remplacement de TRAP de *P. berghei* par l'homologue TRAP de *P. falciparum* diminue l'infectiosité des sporozoïtes de *P. berghei* pour les glandes salivaires du moustique *Anopheles stephensi* (pourtant infectable par *P. falciparum*) (Wengelnik *et al.*, 1999). Ce résultat suggère un couplage fonctionnel avec d'autres protéines du parasite (CSP par exemple). Des mutations introduites dans les domaines adhésifs de TRAP (TSR et domaine A) entraînent une baisse d'infectiosité pour les glandes salivaires (Matuschewski *et al.*, 2002a), de 20% pour des mutants du TSR, de 80% pour des mutants du domaine A, et de 95% pour les doubles mutants (TSR + domaine A). Ces résultats suggèrent des rôles additifs des deux domaines dans l'invasion des glandes salivaires par les sporozoïtes. La protéine MAEBL (apical membrane antigen/erythrocyte-binding-like) est une protéine transmembranaire conservée au sein du genre *Plasmodium* (Kappe *et al.*, 1998). MAEBL est localisée au niveau des micronèmes et à la surface du parasite, et est exprimée par les stades sanguins et les sporozoïtes (Noe and Adams, 1998; Kappe *et al.*, 2001; Kariu *et al.*, 2002; Srinivasan *et al.*, 2004). La délétion de MAEBL chez *P. berghei* n'a pas d'effet sur le cycle érythrocytaire, mais les sporozoïtes déficients en MAEBL sont incapables d'infecter les glandes salivaires du moustique, probablement par défaut d'attachement (Kariu *et al.*, 2002).

Des données de microscopie électronique ont montré que les sporozoïtes de *P. gallinaceum*, une espèce plasmodiale aviaire, infectent les cellules sécrétoires des glandes salivaires en formant une vacuole parasitophore, puis quittent cette vacuole et migrent à travers la cellule pour atteindre la cavité sécrétoire (Pimenta *et al.*, 1994). Il faut cependant noter que le cycle des *Plasmodium* aviaires est très différent de ceux des mammifères. En

effet, ces parasites sont transmis par des moustiques de genre *Culex*, et infectent les macrophages et non pas les hépatocytes. Il n'est donc pas certain que l'infection des glandes salivaires par les espèces plasmodiales de mammifères implique aussi la formation d'une vacuole.

II.4.2. Différenciation des sporozoïtes de glandes salivaires

Les sporozoïtes des oocystes et les sporozoïtes des glandes salivaires présentent des différences phénotypiques majeures. Les sporozoïtes des oocystes reconnaissent et pénètrent les cellules des glandes salivaires du moustique alors que les sporozoïtes des glandes salivaires infectent l'hôte mammifère. Les sporozoïtes des oocystes ne sont pas motiles et sont quasiment non-infectieux chez l'hôte vertébré, alors que les sporozoïtes des glandes salivaires sont motiles et infectieux pour l'hôte mammifère (Vanderberg, 1975; Touray *et al.*, 1992; Matuschewski *et al.*, 2002b). Les sporozoïtes des glandes salivaires ne sont plus capables de réinfecter les glandes salivaires lorsqu'ils sont réinjectés dans l'hémocèle du moustique, ce qui suggère qu'ils sont programmés pour infecter l'hôte vertébré (Touray *et al.*, 1992). De plus, ils sont devenus insensibles aux signaux chimiotactiques qui attirent les sporozoïtes des oocystes vers les glandes salivaires (Akaki and Dvorak, 2005). Ces différences phénotypiques ont été associées à un profil d'expression différentiel de 30 gènes, identifiés comme étant spécifiquement activés dans les sporozoïtes des glandes salivaires (Matuschewski *et al.*, 2002b). Parmi ces gènes, 29 ne sont pas exprimés dans les stades sanguins, ce qui suggère qu'ils codent des protéines impliquées spécifiquement dans les interactions avec les tissus de l'hôte mammifère et/ou la transformation en schizontes hépatiques. Les produits de ces gènes ont été nommés UIS, pour « Up-regulated in Infective Sporozoites ». Cette transition dans l'expression de gènes pourrait être liée à l'activation des sporozoïtes par des signaux émis au contact des glandes salivaires, et/ou résulter de la maturation des sporozoïtes.

II.5. Du moustique au foie

II.5.1. Les sporozoïtes dans la peau

Les sporozoïtes sont injectés dans le derme pendant la première phase de la piqûre par le moustique, pendant laquelle le moustique sonde la peau à la recherche d'un vaisseau sanguin et injecte de la salive, qui contient des vasodilatateurs, des anticoagulants, et des sporozoïtes présents dans les canaux salivaires. Bien que les moustiques puissent héberger des centaines voire des milliers de sporozoïtes dans leurs glandes salivaires, ils n'injectent en général qu'un petit nombre de sporozoïtes (10-200) lors du repas sanguin (Rosenberg *et al.*, 1990; Beier *et al.*, 1991; Ponnudurai *et al.*, 1991; Frischknecht *et al.*, 2004). Les sporozoïtes restent dans la peau pendant plusieurs minutes (Ponnudurai *et al.*, 1991; Sidjanski and Vanderberg, 1997; Matsuoka *et al.*, 2002). Lorsqu'ils sont exposés à une température de 37°C, les sporozoïtes extracellulaires perdent rapidement leur infectiosité ; ils doivent donc rapidement migrer au foie et infecter un hépatocyte pour la survie du parasite.

Des études vidéomicroscopiques de parasites exprimant la GFP ont récemment permis de montrer que les sporozoïtes dans la peau sont très mobiles, et migrent à travers les tissus cutanés avant de pénétrer activement l'endothélium vasculaire pour atteindre la circulation sanguine et quitter le site de piqûre (Vanderberg and Frevert, 2004). Ces études ont montré que les sporozoïtes sont capables de couvrir des distances de plusieurs microns en quelques minutes (Frischknecht *et al.*, 2004; Vanderberg and Frevert, 2004; Frevert *et al.*, 2005). Cette locomotion *in vivo* est très différente de la motilité sur une surface artificielle comme une lame en verre, où les sporozoïtes se déplacent en cercles ou en spirales en gardant leur forme en croissant (Stewart and Vanderberg, 1988). Par ailleurs, la présence d'anticorps anti-sporozoïtes peut ralentir la vitesse et l'efficacité de migration des sporozoïtes dans la peau (Vanderberg and Frevert, 2004). La protéine UIS10, une phospholipase exprimée à la surface des sporozoïtes (Matuschewski *et al.*, 2002b; Bhanot *et al.*, 2005), est impliquée dans la migration du parasite à travers la peau. L'invalidation du gène de UIS10 chez *P. berghei* entraîne une baisse d'infectiosité des sporozoïtes transmis par piqûre de moustique, associée à une diminution de la migration des sporozoïtes à travers les cellules *in vitro* (Bhanot *et al.*, 2005).

II.5.2. Séquestration hépatique

Une fois dans la circulation sanguine, les sporozoïtes atteignent rapidement le foie, où ils sont séquestrés. L'arrêt des sporozoïtes au niveau du foie est un processus très efficace. Les sporozoïtes sont retrouvés dans les hépatocytes dans les minutes qui suivent leur injection par voie intraveineuse (Shin *et al.*, 1982), ce qui suggère l'existence de récepteurs spécifiques sur les cellules bordant les sinusoides hépatiques. La paroi des sinusoides est constituée de cellules endothéliales spécialisées fenestrées, et des cellules de Kupffer, les macrophages du foie qui sont impliqués dans l'élimination de substances dégradées ou étrangères du sang (**Figure 6**). Les cellules stellaires sont situées dans l'espace de Disse, entre les hépatocytes et la barrière du sinusoides. Ce sont des cellules de stockage des graisses et les principales cellules productrices de la matrice extracellulaire hépatique (Gressner and Schafer, 1989).

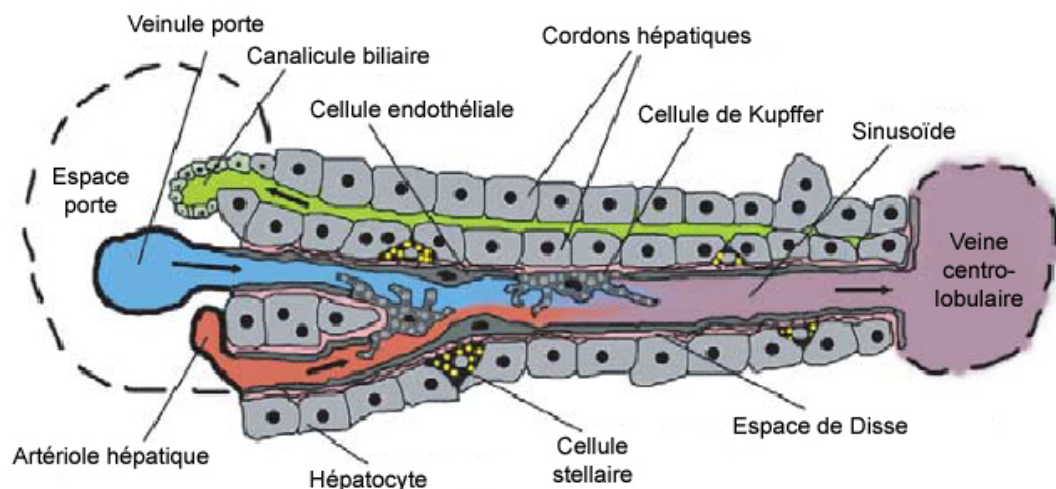


Figure 6. Structure du lobule hépatique, d'après (Frevert, 2004).

La séquestration rapide des sporozoïtes dans le foie repose sur la fixation de la CSP aux glycosaminoglycanes (GAGs) de type héparane sulfate dans l'espace de Disse (**Figure 7**) (Cerami *et al.*, 1992; Pancake *et al.*, 1992; Frevert *et al.*, 1993; Cerami *et al.*, 1994; Frevert *et al.*, 1996; Pinzon-Ortiz *et al.*, 2001). Les héparane sulfates (HS) sont constitués de longues chaînes de répétitions de disaccharides liées à une protéine (HS protéoglycanes, HSPG). Les HSPG sont retrouvés de façon ubiquitaire sur les cellules mammifères (Esko and Selleck, 2002). Les HS du foie sont caractérisés par un haut degré de sulfatation, proche de celui de

l'héparine, comparés aux autres types d'héparane sulfate d'autres tissus (Lyon *et al.*, 1994). Ce haut degré de sulfatation et la forte affinité de la CSP pour les HS hautement sulfatés contribuent probablement à la spécificité tissulaire observée lors de la séquestration des sporozoïtes. Deux domaines dans la CSP, le domaine adhésif TSR dans la région II-plus et un motif chargé positivement en amont de la région conservée I, ont été impliqués (Sinnis *et al.*, 1994; Ying *et al.*, 1997; Rathore *et al.*, 2001).

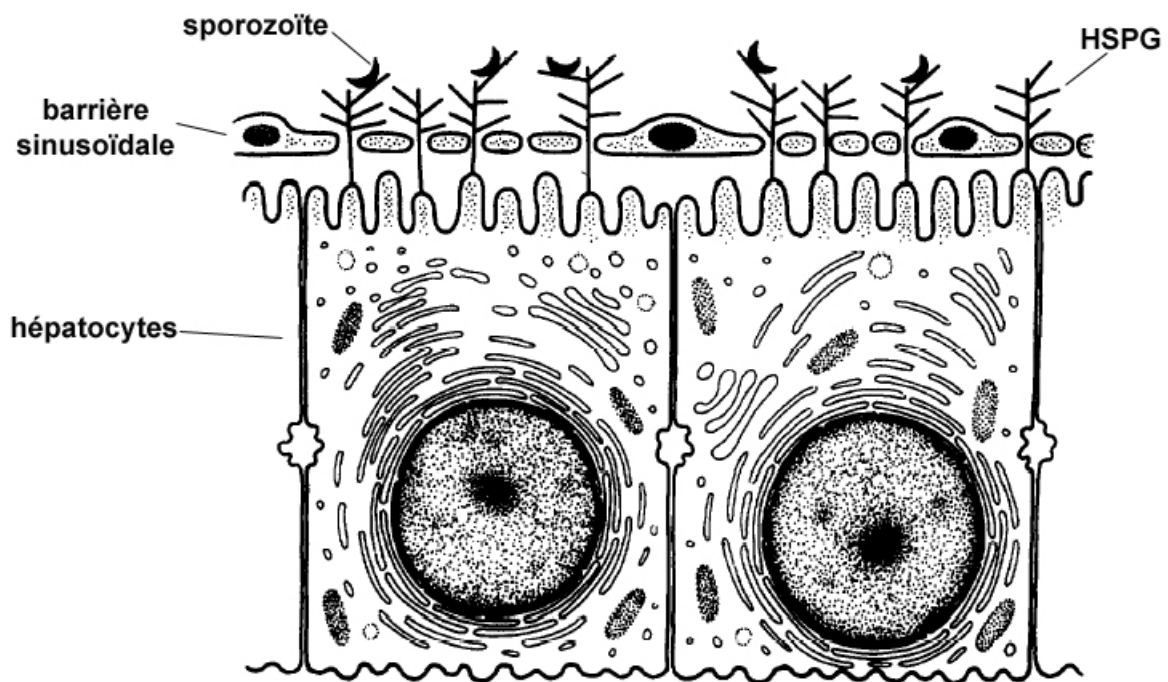


Figure 7. Séquestration hépatique des sporozoïtes, d'après (Sinnis and Sim, 1997). Les sporozoïtes sont arrêtés dans le sinussoïde hépatique via l'interaction avec les héparanes sulfates protéoglycanes hépatiques (HSPG) proéminents à travers les fenestrations de la barrière sinussoïdale.

La nature des HSPG hépatiques récepteurs de la CSP est inconnue. Les HSPG des hépatocytes incluent 2 membres de la famille des syndecans (syndecan 1 et 2) (Couchman, 2003). Syndecan-1 n'est pas essentiel à l'infection car des souris déficientes en syndecan-1 sont aussi sensibles à l'infection par les sporozoïtes de *P. yoelii* que des souris de phénotype sauvage (Bhanot and Nussenzweig, 2002). Les résultats de Pradel et coll. suggèrent que les HSPG qui fixent la CSP dans le foie sont essentiellement ceux de la matrice extracellulaire hépatique, sécrétés par les cellules stellaires, et dont les longues chaînes pourraient être

exposées dans la lumière du sinusoïde à travers les fenestrations de l'endothélium (Pradel *et al.*, 2002).

Les HSPG hépatiques sont impliqués dans la clairance des chylomicrons remnants. Normalement, ces remnants sont éliminés de la circulation sanguine en se fixant spécifiquement sur les HSPG hépatiques, puis sont captés par les hépatocytes via le récepteur aux lipoprotéines de faible densité (low density lipoprotein receptor, LDL-receptor) et une protéine apparentée au récepteur des LDL appelée LRP (LDL receptor related protein) (Mahley and Ji, 1999). La CSP de *P. falciparum* entre en compétition avec les lipoprotéines des remnants pour être éliminée de la circulation (Sinnis *et al.*, 1996; Nussenzweig, 1997), et des souris knockout pour le récepteur des LDL maintenues à un régime riche en graisses sont moins sensibles à l'infection par les sporozoïtes de *P. yoelii* (Sinnis *et al.*, 1996). Ces observations suggèrent que les sporozoïtes ciblent le foie en utilisant un mécanisme physiologique de l'hôte. Une interaction de la CSP avec la protéine LRP a par ailleurs été rapportée (Shakibaei and Frevert, 1996), mais les hépatocytes déficients en LRP restent sensibles à l'infection par les sporozoïtes de *P. yoelii* (Marshall *et al.*, 2000).

Bien que les interactions CSP-HSPG participent clairement à l'arrêt des sporozoïtes dans le foie, d'autres protéines de surface pourraient être impliquées. Par exemple, les deux domaines adhésifs extracellulaires de TRAP, le domaine A et le domaine TSR, interagissent également avec les HSPG (Muller *et al.*, 1993; Robson *et al.*, 1995; Pradel *et al.*, 2002). De plus, les sporozoïtes de *P. falciparum* expriment certaines protéines, notamment PfEMP1 (erythrocyte membrane protein), connues pour être impliquées dans les interactions entre les globules rouges infectés et les cellules endothéliales (Florens *et al.*, 2002; Le Roch *et al.*, 2003). Ces protéines pourraient jouer un rôle dans l'interaction des sporozoïtes avec les cellules endothéliales.

II.5.3. Passage de la barrière sinusoïdale

Les hépatocytes ne sont pas directement accessibles aux sporozoïtes dans le sinusoïde hépatique. Pour les atteindre, les parasites doivent au préalable traverser la barrière sinusoïdale, constituée de cellules de Kupffer et de cellules endothéliales (**Figure 7**). Cette

barrière n'est interrompue que par les fenestrations des cellules endothéliales (de 0,1 μm de diamètre, soit un dixième de la largeur du sporozoïte).

Le modèle le plus souvent proposé pour expliquer le passage de la barrière sinusoïdale par les sporozoïtes repose sur le rôle des cellules de Kupffer, que les sporozoïtes traverseraient pour atteindre l'espace de Disse et les hépatocytes sous-jacents (Danforth *et al.*, 1980; Meis *et al.*, 1983a). En utilisant le modèle d'infection des rats Brown Norway par *P. berghei* (très infectieux chez le rat) *in vivo* et *in vitro*, et en utilisant la microscopie électronique, Pradel et Frevert ont montré que les sporozoïtes pénètrent les cellules de Kupffer en formant une vacuole qui ne fusionne pas avec les lysosomes (Pradel and Frevert, 2001). A partir de ces observations, les auteurs ont proposé que les sporozoïtes traversent les cellules de Kupffer à l'intérieur d'une vacuole pour passer dans l'espace de Disse et infecter les hépatocytes adjacents.

Ce modèle a cependant été partiellement remis en cause par deux études récentes, montrant que les sporozoïtes utilisent leur capacité de transcytose, c'est-à-dire de migration à travers les cellules sans formation de vacuole, pour passer la barrière sinusoïdale. En effet, les mutants de *P. berghei* déficients en SPECT (sporozoite protein essential for cell traversal)-1 ou SPECT-2 perdent leur capacité de migration à travers les cellules, mais restent capables d'infecter les hépatocytes (par formation d'une vacuole) et de s'y développer *in vitro* (Ishino *et al.*, 2004; Ishino *et al.*, 2005a). Cependant, ces mutants sont très peu infectieux lorsqu'ils sont injectés par voie intraveineuse chez le rat, probablement parce qu'ils ne peuvent pas traverser la barrière sinusoïdale. L'infectiosité de ces mutants est en effet totalement restaurée après déplétion des cellules de Kupffer, qui entraîne probablement une perte d'intégrité de la barrière sinusoïdale. Ces observations démontrent que la transcytose est essentielle au passage de la barrière sinusoïdale par les sporozoïtes, mais ne permettent pas de déterminer quel est le type cellulaire traversé par les sporozoïtes. Notamment, on ne peut pas exclure que les sporozoïtes puissent migrer à travers les cellules endothéliales sinusoïdales pour atteindre les hépatocytes.

Les protéines SPECT-1 et SPECT-2 pourraient également jouer un rôle au cours de la migration des sporozoïtes dans la peau, mais ce rôle n'a pas été étudié. Il est intéressant de noter que la phospholipase PbPL (UIS10) est impliquée dans la migration des sporozoïtes de *P. berghei* dans la peau, mais n'est pas nécessaire au passage de la barrière sinusoïdale (Bhanot *et al.*, 2005), ce qui suggère que l'activité de transcytose des sporozoïtes est un

processus complexe qui pourrait impliquer différentes molécules en fonction du type de cellules traversées *in vivo*.

II.6. Infection des hépatocytes

II.6.1. Migration avant infection

Selon un modèle couramment admis, l'infection des hépatocytes par les sporozoïtes implique la sécrétion du contenu des vésicules sécrétoires (micronèmes notamment) au pôle apical du parasite. Des protéines adhésives ainsi exposées à la surface du parasite peuvent alors fixer des récepteurs sur la surface des hépatocytes pour former une jonction, dont la redistribution antéro-postérieure permet au parasite de pénétrer activement dans la cellule au sein d'une vacuole. Cependant, les sporozoïtes n'infectent pas immédiatement les hépatocytes selon un mode productif, c'est-à-dire par formation d'une vacuole où le parasite se multiplie. En effet, Mota et coll. ont montré que les sporozoïtes traversent plusieurs cellules hépatocytaires par transcytose active, *in vitro* (**Figure 8**) et *in vivo*, avant de finalement infecter une cellule par formation d'une vacuole parasitophore dans laquelle ils se développent en schizonte (Mota *et al.*, 2001b). Des observations en vidéo-microscopie intravitale ont confirmé que les sporozoïtes migrent pendant plusieurs minutes à travers les hépatocytes *in vivo* (Frevert *et al.*, 2005). Certains hépatocytes traversés réparent leur membrane et survivent (Mota *et al.*, 2001b), alors que d'autres meurent par nécrose (Meis *et al.*, 1983b). Mota et coll ont proposé que la migration à travers les hépatocytes est une étape obligatoire précédant l'infection par formation d'une vacuole (Mota *et al.*, 2001b). Cependant, ce modèle a été remis en cause par la démonstration que les sporozoïtes de *P. berghei* déficients en SPECT-1 et SPECT-2, qui ont perdu leur capacité de transcytose, gardent pourtant leur capacité d'infecter les hépatocytes par formation d'une vacuole (Ishino *et al.*, 2004; Ishino *et al.*, 2005a).

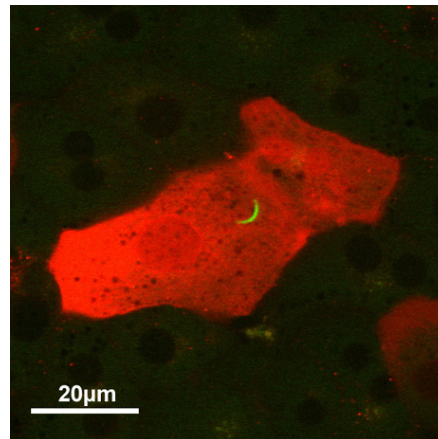


Figure 8. Migration d'un sporozoïte de *P. berghei* (vert) à travers un hépatocyte de souris, révélée par la présence de dextran-rhodamine dans la cellule (rouge) (Silvie *et al.*, 2003a).

Pourquoi les sporozoïtes migrent-ils à travers les hépatocytes ? Plusieurs hypothèses ont été avancées. Les sporozoïtes pourraient migrer à travers les cellules jusqu'à ce qu'ils rencontrent un hépatocyte fonctionnellement plus apte au développement du parasite. Mota et coll. ont par ailleurs montré que la migration des sporozoïtes à travers les cellules entraîne la sécrétion de l'hépatocyte growth factor (HGF), qui, en se fixant sur son récepteur c-Met sur les hépatocytes avoisinants, favoriserait le développement ultérieur des schizontes hépatiques (Carrolo *et al.*, 2003). Il faut cependant noter que ces résultats ont été obtenus essentiellement avec le modèle d'infection de cellules HepG2 par *P. berghei*, système dans lequel la même équipe a en fait démontré que l'HGF entraîne une résistance des cellules à l'apoptose, qui pourrait expliquer l'effet bénéfique observé sur le développement des schizontes *in vitro* (Leiriao *et al.*, 2005). Il reste à prouver que des mécanismes similaires sont impliqués au cours de l'infection des hépatocytes *in vivo*. Il a également été proposé que les sporozoïtes migrent à travers les travées hépatocytaires pour quitter le site d'invasion du sinusoiide, notamment pour échapper aux facteurs pro-inflammatoires sécrétés par les cellules de Kupffer stimulées lors du passage des sporozoïtes (Frevert, 2004).

Mota et coll. ont aussi montré que la migration à travers les hépatocytes active les sporozoïtes en induisant la sécrétion du contenu des micronèmes par un mécanisme impliquant des signaux dépendant du calcium (Mota *et al.*, 2002). Cette activation est observée aussi bien avec des cellules hépatocytaires qu'avec d'autres types cellulaires (Mota *et al.*, 2002). Les protéines stockées dans les micronèmes, notamment TRAP, sont rapidement redistribuées à la surface du parasite lors du contact avec les cellules (Gantt *et al.*, 2000;

Silvie *et al.*, 2004). Ces protéines micronémales pourraient alors agir comme ligands participant à la jonction mobile impliquée dans la formation de la vacuole.

Selon une autre alternative, la formation de la jonction pourrait n'être rendue possible qu'après épuisement des molécules impliquées dans l'activité migratoire des parasites. Enfin, les études récentes montrant l'implication de protéines de rhoptries dans la formation de la jonction suggèrent que la décharge, au moins partielle, du contenu des rhoptries pourrait constituer un élément essentiel de la transition à un mode invasif productif (Alexander *et al.*, 2005; Lebrun *et al.*, In Press).

La nature des mécanismes moléculaires à l'origine de la transition entre mode transmigratoire et mode invasif des sporozoïtes reste inconnue. Le contact avec les cellules entraîne le clivage de l'extrémité N-terminale de la CSP par une cystéine protéase parasitaire (Coppi *et al.*, 2005). Ce clivage de l'extrémité N-terminale de la CSP lorsque les sporozoïtes entrent en contact avec les hépatocytes pourrait participer à des signaux d'activation des sporozoïtes.

II.6.2. Ligands parasitaires et récepteurs hépatocytaires

Les détails des événements moléculaires qui ont lieu au cours de l'infection des hépatocytes par les sporozoïtes ne sont pas connus. En particulier, les ligands parasitaires et les récepteurs hépatocytaires impliqués n'ont pas été identifiés.

Outre leur rôle dans la séquestration des sporozoïtes au niveau du foie, les HSPG sont vraisemblablement impliqués dans l'attachement des sporozoïtes aux cellules cibles via la CSP (Pinzon-Ortiz *et al.*, 2001). Par contre, le rôle des HSPG au cours de l'étape d'invasion des cellules est moins évident. En effet, l'élimination des HSPG de la surface des cellules n'a qu'un effet limité sur l'invasion des sporozoïtes de *P. berghei* (Frevert *et al.*, 1996). Par ailleurs, les souris déficientes en syndecan-1, un HSPG majeur exprimé par de nombreux types cellulaires, restent sensibles à l'infection par *P. yoelii* (Bhanot and Nussenzweig, 2002).

Jusqu'à présent, TRAP constitue le principal candidat proposé comme ligand potentiel lors de l'invasion des hépatocytes. Les deux domaines adhésifs de TRAP, TSR et domaine A, n'ont apparemment aucun rôle détectable dans la motilité du sporozoïte ou dans l'attachement aux cellules, mais sont impliqués dans l'invasion des cellules (Matuschewski *et al.*, 2002a). Le domaine TSR de TRAP, comme celui de la CSP, se fixe aux HSPG hépatiques (Robson *et*

al., 1995). Cependant, ce domaine contribue de façon mineure à l'invasion, car des mutations introduites dans le TSR de TRAP chez *P. berghei* n'ont qu'un effet limité sur l'invasion, similaire à celui observé après élimination des HS de la surface cellulaire (Frevert *et al.*, 1996; Matuschewski *et al.*, 2002a). Le domaine A de TRAP fixe également l'héparine et d'autres glycosaminoglycanes, mais de manière indépendante du MIDAS (McCormick *et al.*, 1999). L'étude de mutants du domaine A de TRAP chez *P. berghei* a permis de montrer que ce domaine joue un rôle majeur au cours de l'infection des cellules, et ce rôle dépend du motif MIDAS, mais est indépendant des glycosaminoglycanes (Matuschewski *et al.*, 2002a). Des mutations introduites dans le site MIDAS de TRAP chez *P. berghei* réduisent de 80% l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes. De plus, l'introduction de mutations à la fois dans le TSR et dans le domaine A de TRAP élimine presque totalement l'infectiosité des sporozoïtes de *P. berghei*, aussi bien *in vivo* (infection des glandes salivaires chez le moustique et des hépatocytes chez l'hôte mammifère) qu'*in vitro* dans les cellules HepG2 (Matuschewski *et al.*, 2002a). Ces résultats suggèrent que ces deux domaines ont des fonctions additives pendant l'infection par les sporozoïtes (Matuschewski *et al.*, 2002a).

Une étude récente a révélé que le domaine A de TRAP de *P. berghei* interagit avec une protéine abondante dans le sérum, la fétuine A (Jethwaney *et al.*, 2005). Les souris déficientes en fétuine A restent cependant sensibles à l'infection par les sporozoïtes de *P. berghei*. Le rôle précis de cette molécule au cours de l'invasion des sporozoïtes reste donc à définir. Les domaines A de différentes protéines ont été décrits pour interagir avec diverses molécules comme les molécules d'adhérence intercellulaire ICAM-1 et ICAM-2, le collagène, la laminine, ou encore les composés du complément C3 et C4 (Colombatti *et al.*, 1993). Des souris déficientes en ICAM-1, ICAM-2, ou en composés C3 ou C4 du complément restent sensibles à l'infection par *P. yoelii*, ce qui permet d'exclure un rôle essentiel de ces molécules au cours de l'invasion des sporozoïtes (Sultan *et al.*, 1997a). Plusieurs études ont par ailleurs permis de montrer que d'autres molécules de surface des cellules cibles ne sont pas nécessaires à l'invasion par les sporozoïtes, dont CD36 (Sinnis and Febbraio, 2002), le récepteur des LDL (Sinnis *et al.*, 1996) et le récepteur LRP (Marshall *et al.*, 2000). Enfin, on ne peut exclure que le rôle essentiel du domaine A au cours de l'invasion soit d'interagir non pas avec un récepteur hépatocytaire mais avec une autre protéine de surface du parasite, par exemple pour permettre un couplage d'une telle protéine avec la machinerie motrice du parasite.

En dehors de la CSP et de TRAP, d'autres protéines du sporozoïte ont été impliquées au cours de l'infection des hépatocytes (Baldacci and Menard, 2004). En particulier, des protéines connues pour être impliquées dans l'invasion des globules rouges par les mérozoïtes ont été décrites comme participant également à l'invasion des sporozoïtes, dont EBA-175 (Gruner *et al.*, 2001), un ligand interagissant avec des acides sialiques de la glycophorine A des érythrocytes, des produits de la famille génique P235 (Preiser *et al.*, 2002), et l'antigène membranaire apical (AMA)-1, une protéine des micronèmes nécessaire à l'invasion des mérozoïtes, et qui est présente à la surface des sporozoïtes où elle est clivée de manière similaire à TRAP (Silvie *et al.*, 2004). L'inactivation du gène de AMA-1 n'est pas possible chez *Plasmodium* (Triglia *et al.*, 2000) ni chez *Toxoplasma* (Hehl *et al.*, 2000). L'obtention de mutants conditionnels de *Toxoplasma* déficients en AMA-1 a permis de démontrer que cette protéine des micronèmes est nécessaire à l'invasion des parasites, et est impliquée dans la formation d'une jonction étroite entre les tachyzoïtes et la surface des cellules cibles (Mital *et al.*, 2005). Une étude plus récente a de plus révélé que chez *Toxoplasma*, AMA-1 s'associe à des protéines provenant du collet des rhoptries, notamment à une protéine nommée RON-4 (rhoptry neck protein 4), localisée au niveau de la jonction mobile pendant l'invasion (Alexander *et al.*, 2005; Lebrun *et al.*, In Press). AMA-1 pourrait donc être impliquée dans la formation de la jonction entre le sporozoïte et l'hépatocyte. AMA-1 étant nécessaire à la multiplication érythrocytaire du parasite, seule l'utilisation de mutants conditionnels permettrait de confirmer le rôle de AMA-1 au cours de l'invasion des sporozoïtes.

Enfin, deux protéines des micronèmes des sporozoïtes ont été récemment identifiées comme indispensables à l'invasion des hépatocytes. Ces protéines, nommées P36 et P36p (**Figure 9**), appartiennent à une famille de protéines caractérisées par la présence de domaines comportant 6 cystéines conservées (Ishino *et al.*, 2005b; van Dijk *et al.*, 2005). Les sporozoïtes de *P. berghei* déficients en Pb36 ou en Pb36p ont une motilité normale et sont capables de migrer à travers les cellules. Ces mutants restent infectieux pour les glandes salivaires du moustique mais ne sont plus capables de pénétrer dans les hépatocytes en formant une vacuole (Ishino *et al.*, 2005b). Ce phénotype est donc très différent de celui observé chez les mutants déficients en TRAP (sporozoïtes non motiles et non infectieux chez le moustique et chez l'hôte mammifère) ou en SPECT-1 et SPECT-2 (sporozoïtes motiles, infectieux pour les glandes salivaires du moustique mais ayant perdu leur capacité de transcytose chez l'hôte mammifère, sans altération de la capacité à former une vacuole) (voir

Tableau 1). Ces résultats suggèrent que P36 et P36p pourraient être impliquées dans la formation de la jonction avec l'hépatocyte, peut-être comme ligand interagissant avec un récepteur hépatocytaire.

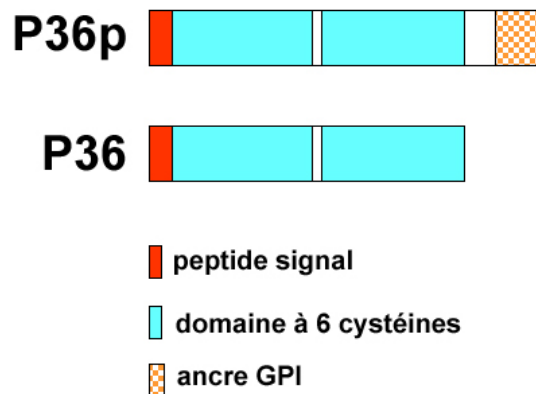


Figure 9. Structure schématique de la P36p et de la P36, deux protéines des sporozoïtes jouant un rôle essentiel dans l'infection des hépatocytes (Ishino *et al.*, 2005c; van Dijk *et al.*, 2005).

II.6.3. Développement des formes exo-érythrocytaires

Une fois internalisés dans un hépatocyte au sein d'une vacuole parasitophore, les sporozoïtes se différencient en schizontes hépatiques, ou formes exo-érythrocytaires (EEFs, exo-erythrocytic forms). Lors de cette différenciation, les sporozoïtes sont typiquement localisés à proximité du noyau de l'hépatocyte infecté. Au cours des 24 premières heures, les organelles sont dissociées (notamment le complexe membranaire interne) (Kaiser *et al.*, 2003). En 2 jours pour les parasites de rongeurs, ou 6 à 7 jours pour les parasites de primates, le schizonte grossit jusqu'à atteindre une taille qui dépasse la taille initiale de la cellule (**Figure 10**). Cette croissance des formes exo-érythrocytaires est caractérisée par une synthèse intense de membranes et d'acides nucléiques, aboutissant à la formation de milliers de mérozoïtes capables d'infecter les globules rouges. Les mécanismes moléculaires impliqués au cours du développement des formes exo-érythrocytaires ne sont pas connus. Deux protéines, UIS-3 et UIS-4, exprimées par les sporozoïtes et les schizontes hépatiques sont

indispensables au développement du parasite dans l'hépatocyte, mais pas à l'invasion de l'hépatocyte (Mueller *et al.*, 2005b; Mueller *et al.*, 2005a). Ces protéines pourraient être impliquées dans les interactions du schizonte avec la cellule infectée.

Si les schizontes ne se développent dans les cellules qu'au sein d'une vacuole parasitophore (Mota *et al.*, 2001b), les sporozoïtes peuvent également se transformer en pseudo-formes exo-érythrocytaires en l'absence de cellules, simplement par incubation à 37°C en présence de sérum (Kaiser *et al.*, 2003). Les sporozoïtes de *P. berghei* cultivés en l'absence de cellules subissent les transformations morphologiques typiques de la différenciation en formes exo-érythrocytaires : désorganisation des micronèmes et du complexe membranaire interne, synthèse de HSP70, expression des messagers de protéines de mérozoïtes (MSP1 et Hep17/EXP1) (Kaiser *et al.*, 2003). Cependant, la maturation de ces pseudo-formes exo-érythrocytaires reste très limitée. Cette différenciation induite par le passage des parasites à 37°C est probablement responsable de la perte rapide d'infectiosité des sporozoïtes placés à 37°C. Ces résultats montrent que la transformation des sporozoïtes suit un programme indépendant des interactions sporozoïte-cellule hôte, et où les variations de température jouent probablement un rôle essentiel.

II.7. Modèles d'étude de la phase hépatique

Un obstacle pour l'étude de la biologie des sporozoïtes est l'accès difficile à ces stades parasitaires. En effet, les sporozoïtes sont isolés des glandes salivaires d'anophèles, et sont obtenus en nombre limité. Des techniques d'obtention de sporozoïtes *in vitro* dans des cultures de cellules d'insecte ont été décrites et pourraient constituer des alternatives à l'infection des moustiques (Warburg and Miller, 1992; Warburg and Schneider, 1993; Al-Olayan *et al.*, 2002). Le cycle des parasites de rongeurs (*P. yoelii* et *P. berghei* notamment) peut être entièrement entretenu au laboratoire par transmission entre les rongeurs et le moustique. *P. yoelii* et *P. berghei* ont été initialement isolés de rats arboricoles en Afrique (Landau and Killick-Kendrick, 1966), mais la possibilité d'infecter expérimentalement des souris et des rats de laboratoire a permis une large utilisation de ces parasites comme modèles d'étude de l'infection par *Plasmodium*. Dans le cas des parasites humains, la culture continue

des stades érythrocytaires de *P. falciparum* (Trager and Jensen, 1976) permet d'obtenir des gamétocytes *in vitro*, qui sont transmis aux moustiques par nutrition artificielle sur membrane (Ponnudurai *et al.*, 1982). *P. falciparum* n'infecte pas les rongeurs, et n'infecte de manière expérimentale que quelques espèces de primates en dehors de l'homme (Druilhe *et al.*, 1982; Meis *et al.*, 1990; Zapata *et al.*, 2002).

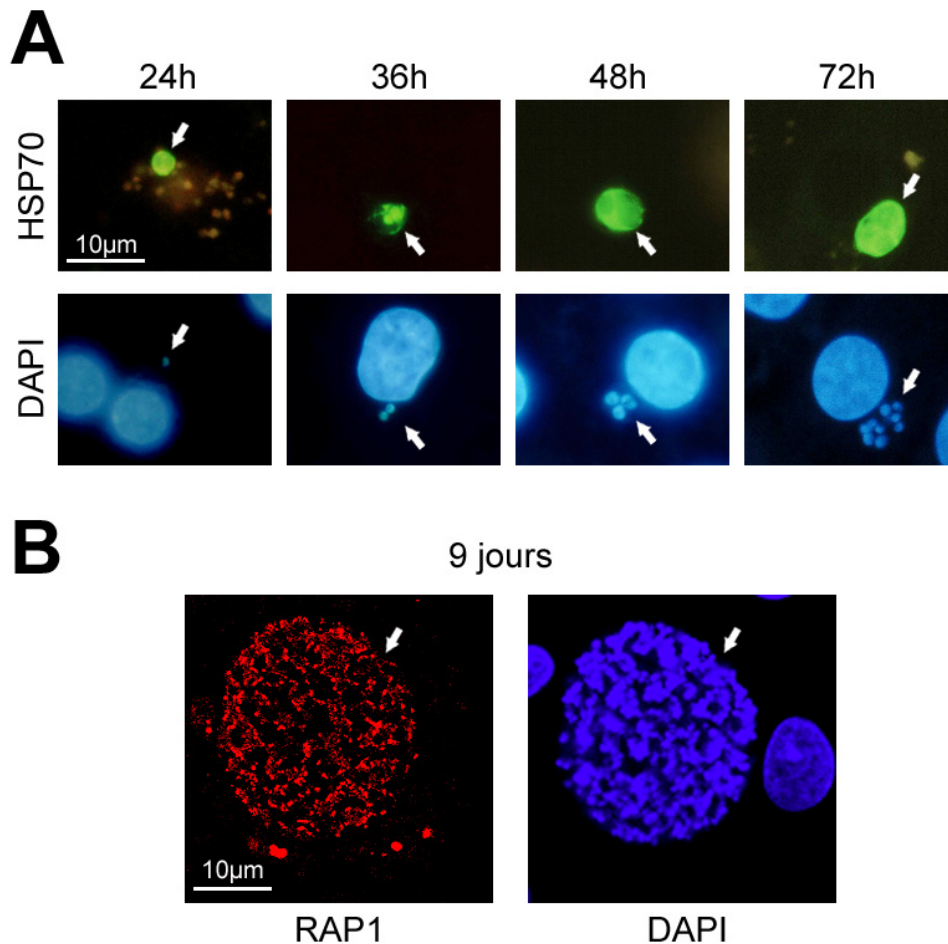


Figure 10. Développement des formes exo-érythrocytaires de *P. falciparum* *in vitro*, dans des hépatocytes primaires humains. A. Les parasites intrahépatiques, indiqués par une flèche, ont été marqués par des anticorps anti-HSP70 de *Plasmodium* (en vert) et les noyaux de la cellule et du parasite par DAPI (bleu). B. Schizonte mature 9 jours post-infection, marqué par anticorps anti-RAP1 (rhoptry associated protein 1) (en rouge) et DAPI (en bleu) (photos O. Silvie).

Les cellules permettant le développement des formes exo-érythrocytaires *in vitro* dépendent de l'espèce plasmodiale. *P. berghei* et *P. yoelii* infectent les hépatocytes isolés de rongeurs, ainsi que certaines lignées d'hépatome de souris, notamment les cellules Hepa1-6 (Mota and Rodriguez, 2000). *P. berghei* mais pas *P. yoelii* infecte les cellules d'hépatocarcinome humain HepG2 (Hollingdale *et al.*, 1983; Calvo-Calle *et al.*, 1994). Alors que *P. vivax* infecte aussi bien les hépatocytes primaires humains que les cellules HepG2 (Mazier *et al.*, 1984; Hollingdale *et al.*, 1985), le développement de schizontes hépatiques de *P. falciparum* n'a jusqu'à présent été observé que dans des hépatocytes primaires humains ou de certains singes *in vitro* (Smith *et al.*, 1984; Mazier *et al.*, 1985; Millet *et al.*, 1991). En particulier, *P. falciparum* ne se développe pas dans les cellules HepG2 (Hollingdale *et al.*, 1984; Mazier *et al.*, 1985).

III. Les tétraspanines

Les tétraspanines constituent une famille de protéines membranaires conservées au cours de l'évolution. La famille des tétraspanines a été découverte vers la fin des années 80 avec le clonage successif de CD63 (Hotta *et al.*, 1988), CD37 (Schwartz-Albiez *et al.*, 1988), CD81 (Oren *et al.*, 1990), CD9 (Boucheix *et al.*, 1991) et CD53 (Wright *et al.*, 1993), dont les séquences protéiques possédaient des homologies significatives. Cette superfamille est ancienne dans l'évolution puisqu'on retrouve des tétraspanines chez des invertébrés (drosophile, schistosomes, *Caenorhabditis Elegans*), et des champignons (Todres *et al.*, 2000; Gourgues *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2005). Des molécules ressemblant aux tétraspanines ont été identifiées chez certains protozoaires (mais pas chez *Plasmodium*) et dans des plantes (Huang *et al.*, 2005). La conservation de l'organisation des gènes codant pour les tétraspanines suggère fortement que ces molécules dérivent d'un ancêtre commun, par duplication (Wright *et al.*, 1993). Chez les mammifères, il existe 32 tétraspanines, dont seulement une minorité a fait l'objet d'études approfondies (**Figure 11**).

III.1. Structure des tétraspanines

Les tétraspanines sont des protéines transmembranaires de 204 à 355 acides aminés caractérisées par leur structure commune. Elles sont formées de 4 domaines transmembranaires délimitant deux régions extracellulaires de tailles inégales, la petite boucle extracellulaire (domaine EC1) et la grande boucle extracellulaire (domaine EC2). La petite boucle (EC1) comprend 20-28 acides aminés et le grand domaine extracellulaire (EC2) 76-131. Les extrémités cytoplasmiques de la molécule comprennent en règle générale moins de 19 acides aminés, et le domaine cytoplasmique présent entre les 2^{ème} et 3^{ème} régions transmembranaires moins de 5 acides aminés. Les tétraspanines présentent un certain nombre de caractéristiques qui les différencient des autres protéines à quatre domaines transmembranaires (**Figure 12**).

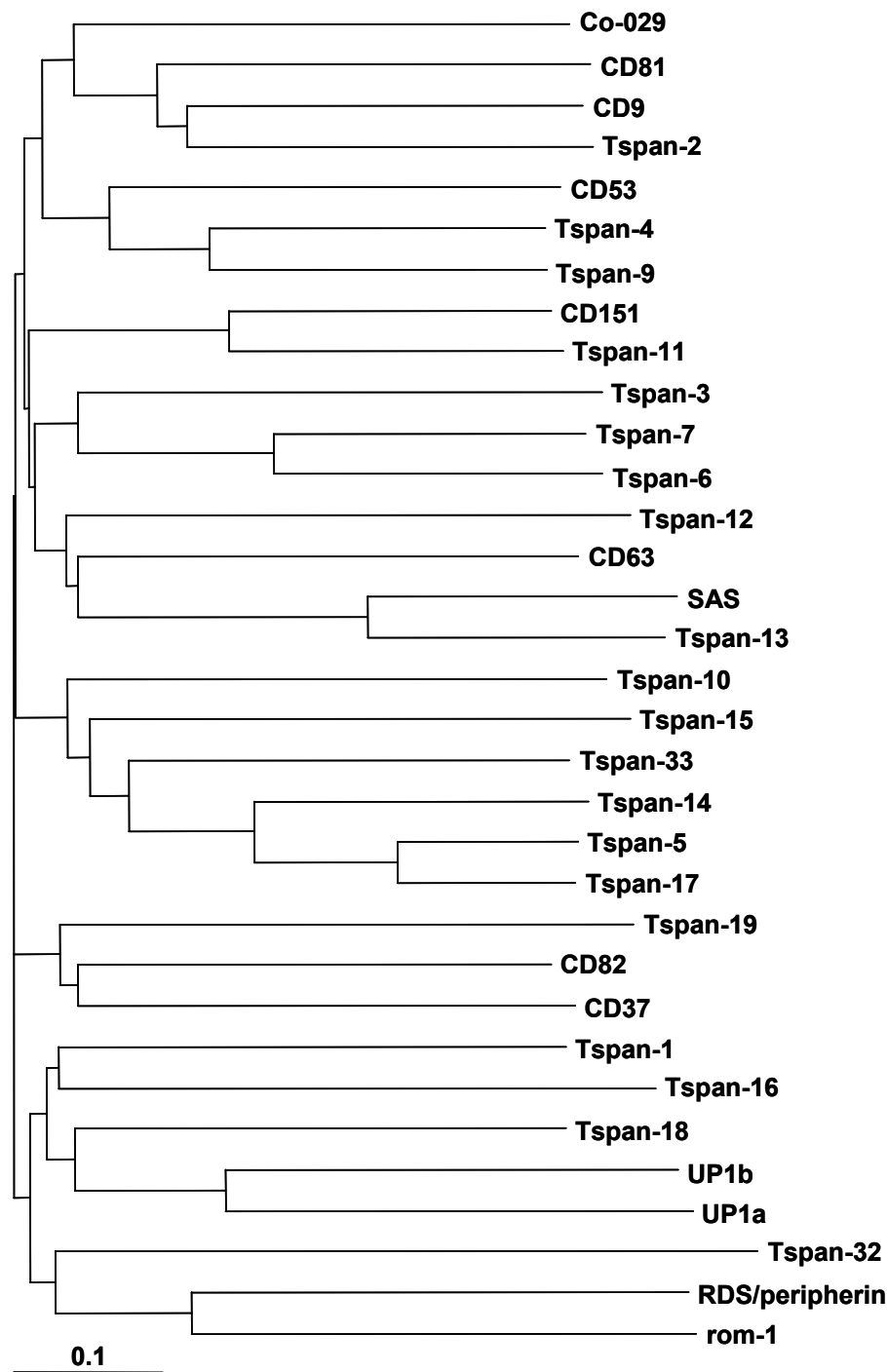


Figure 11. Famille des tétraspanines de mammifères, arbre de distance.

L'alignement des séquences primaires des tétraspanines montre que les plus fortes homologies se retrouvent dans les régions transmembranaires. Il faut noter que dans ces régions hydrophobes il existe des résidus polaires hautement conservés (asparagine, acide glutamique, glutamine). La présence de tels résidus dans la bicouche lipidique est

énergétiquement défavorable, ce qui suggère que ces résidus pourraient participer soit à la stabilisation de la tétraspanine en interagissant avec des résidus polaires présents dans un domaine transmembranaire voisin, soit à la formation de complexes avec d'autres protéines transmembranaires. Les domaines intracytoplasmiques présentent peu d'homologie entre eux. Certaines tétraspanines comme CD63, CD82 ou CD151 possèdent à leur extrémité C-terminale un site potentiel d'internalisation (YXX ϕ où ϕ est un acide aminé hydrophobe) (Stipp *et al.*, 2003b).

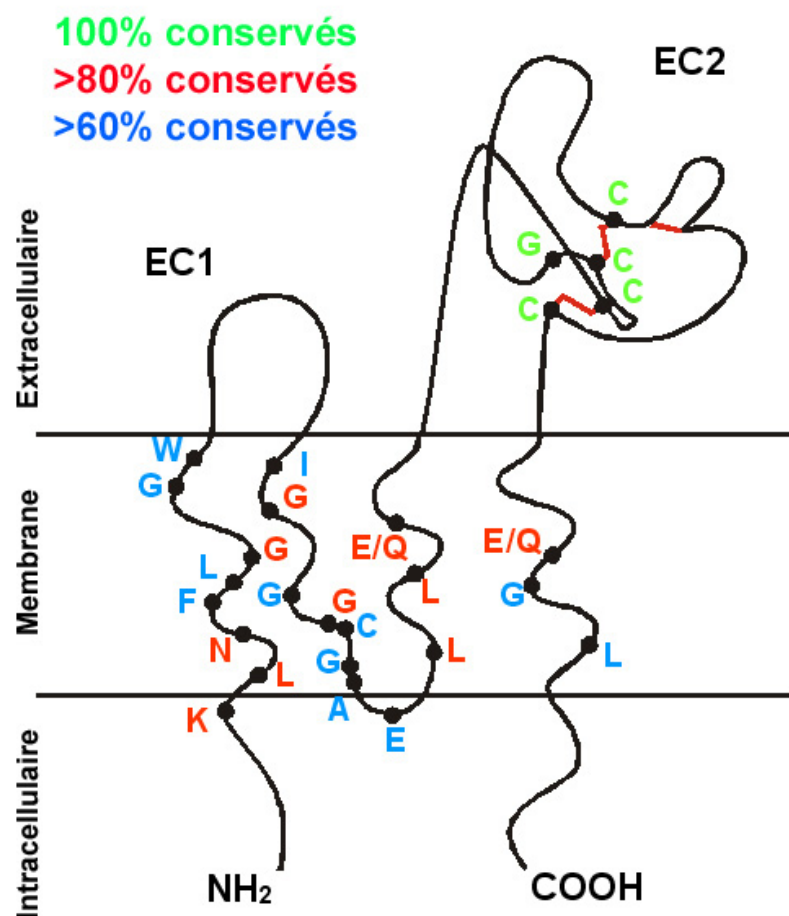


Figure 12. Structure schématique des tétraspanines. EC1 = petite boucle extracellulaire, EC2 = grande boucle extracellulaire. Les acides aminés conservés entre tétraspanines sont indiqués en vert (présents dans 100% des tétraspanines), en rouge (présents dans plus de 80% des tétraspanines) et en bleu (présents dans plus de 60% des tétraspanines).

Les domaines extracellulaires présentent eux une grande variabilité de taille et de séquence. Cependant le domaine EC2 possède quelques acides aminés conservés, en particulier 4 cystéines présentes dans toutes les tétraspanines, et localisées à distance constante des régions transmembranaires. Deux cystéines sont situées dans un motif CCG, à environ 50 acides aminés de la troisième région transmembranaire. Une autre cystéine est dans un motif PxxC et une dernière est située 11 acides aminés en amont du quatrième domaine transmembranaire. Ces cystéines forment des ponts disulfures et sont impliquées dans la conformation du domaine EC2 des tétraspanines. Les tétraspanines peuvent être classées en trois groupes en fonction du nombre de ponts disulfures présents dans le domaine EC2 (groupe 1 avec CD81, CD9 et CD53 : deux ponts disulfures; groupe 2, largement majoritaire, avec entre autres CD37, CD82 et CD151 : trois ponts disulfures ; groupe 3 avec Tspan-5, Tspan-10 et Tspan-15 : quatre ponts disulfures). Les tétraspanines sont N-glycosylées, à quelques exceptions près, dont CD81, qui n'est pas glycosylé.

La structure du grand domaine extracellulaire EC2 de CD81 a été analysée par cristallographie (Kitadokoro *et al.*, 2001) (**Figure 13**). Après cristallisation, les auteurs ont obtenu un dimère de deux molécules EC2, chacune constituée de 5 hélices alpha organisées en deux domaines : les hélices A et E interagissent entre elles pour former un "pied" coiffé des trois autres hélices (B, C et D). La "coiffe" est stabilisée par deux ponts disulfures. Le « pied » contient une face hydrophobe qui participerait à la dimérisation du domaine EC2 en solution, mais pourrait être impliquée dans d'autres types d'interactions dans la molécule entière, notamment avec la petite boucle extracellulaire de CD81 (domaine EC1) (Seigneuret, 2006). La modélisation de la structure du domaine EC2 de plusieurs tétraspanines a permis d'obtenir une structure proche de celle observée avec le cristal de CD81, c'est à dire une structure conservée au niveau du « pied », avec l'insertion d'un domaine variable en taille et en séquence dans la « coiffe » (Bienstock and Barrett, 2001; Seigneuret *et al.*, 2001). Ce domaine variable pourrait donner sa spécificité à chaque tétraspanine. Dans le cas de CD81, cette région variable du EC2 est constituée des hélices C et D, et contient le site de fixation de la glycoprotéine d'enveloppe E2 du virus de l'hépatite C (Higginbottom *et al.*, 2000) (ce point sera repris plus loin).

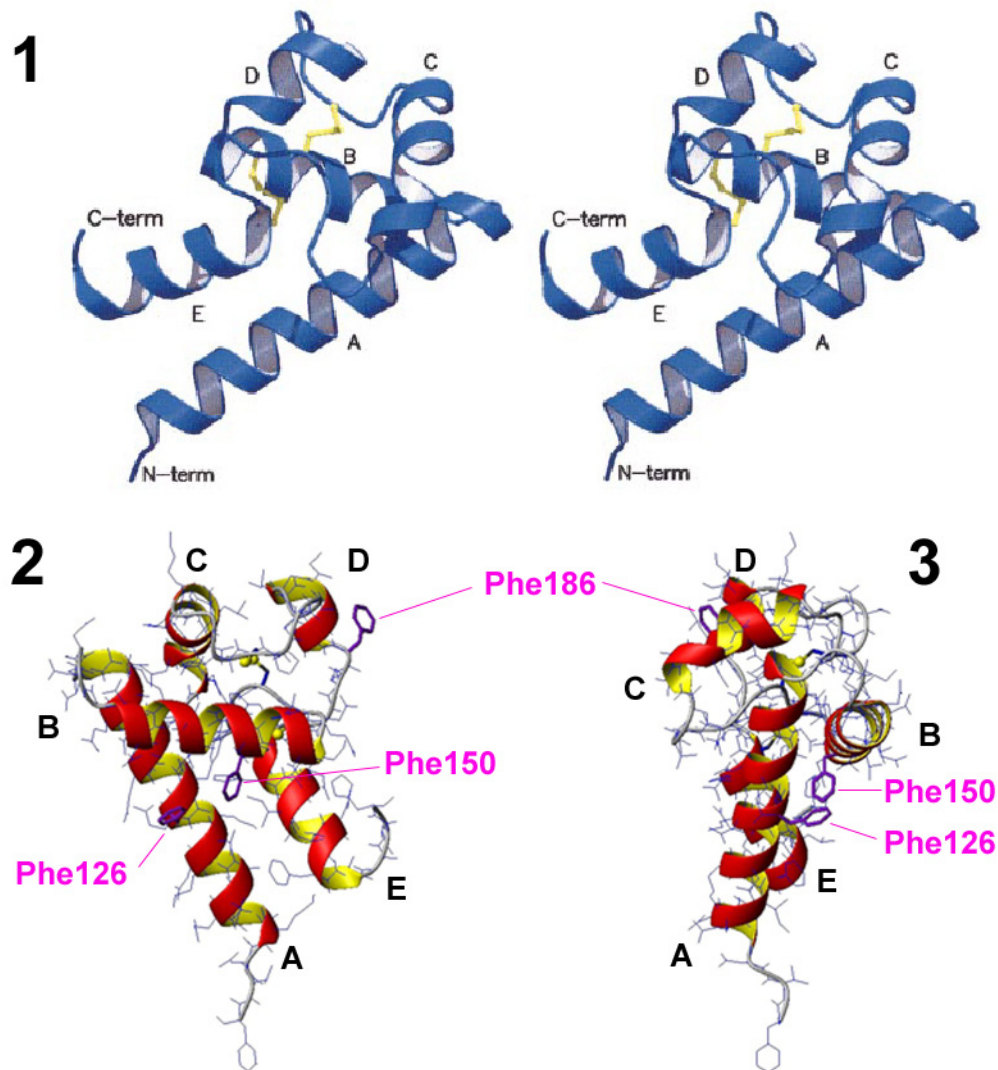


Figure 13. Structure tridimensionnelle du domaine EC2 de CD81, d'après (Kitadokoro *et al.*, 2001). 1. Vue en stéréo du domaine EC2, constitué de 5 hélices alpha. Les hélices A et E forment un « pied » sur lequel repose une « coiffe » formée par les hélices B, C, et D. Les deux ponts disulfures apparaissent en jaune. 2 et 3. Représentations des hélices du domaine EC2 de CD81 humain, avec les chaînes latérales des acides aminés. Les phénylalanines en positions 126 et 150 forment une interface hydrophobe potentiellement impliquée dans des interactions intra- ou inter-moléculaires. La phénylalanine 186 est impliquée dans la fixation de la glycoprotéine d'enveloppe E2 du virus de l'hépatite C.

III.2. Expression tissulaire et localisation subcellulaire

L'expression tissulaire est variable d'une tétraspanine à l'autre, mais de manière générale il semble que toutes les cellules de l'organisme, à l'exception des spermatozoïdes,

expriment des tétraspanines (Boucheix and Rubinstein, 2001), y compris les érythrocytes, où CD151 a récemment été identifié comme étant l'antigène de groupe sanguin MER2 (Karamatic Crew *et al.*, 2004). Certaines tétraspanines, comme CD9, CD63, CD81, CD82 et CD151, sont largement exprimées dans l'organisme, sans être ubiquitaires. A titre d'exemple, CD81 est exprimé sur les cellules épithéliales, les fibroblastes, les cellules endothéliales, et sur la plupart des cellules du sang en dehors des érythrocytes, des plaquettes et des polynucléaires neutrophiles. D'autres tétraspanines ont un spectre d'expression restreint. CD53 par exemple est un marqueur leucocytaire, alors que CD37 n'est fortement exprimé que sur les cellules lymphoïdes B. Certaines tétraspanines ne sont exprimées qu'au niveau de structures tissulaires spécialisées, comme les uroplakines UPIa et UPIb, qui sont des constituants des plaques urothéliales, et les protéines RDS/périphérine et Rom-1, trouvées uniquement dans la rétine.

La plupart des tétraspanines sont exprimées à la surface des cellules, mais certaines sont également présentes en quantités importantes dans des compartiments intracellulaires (Berditchevski and Odintsova, 1999; Sincock *et al.*, 1999). Par exemple, CD63 possède au niveau de son extrémité cytoplasmique C-terminale un signal d'internalisation GYEVN, qui cible la majeure partie de CD63 dans les lysosomes et probablement les corps multivésiculaires (Rous *et al.*, 2002). D'autres tétraspanines, incluant Tspan-1, CD82, CD37, Tspan-3, CD151, Tspan-7 (A15/TALLA-1), Tspan-6 et CO-029, possèdent également un site potentiel d'internalisation au niveau de leur extrémité C-terminale, mais le rôle de ce motif dans la fonction de ces tétraspanines n'est pas connu (Stipp *et al.*, 2003b). Les tétraspanines s'accumulent par ailleurs dans les corps multivésiculaires, qui fusionnent avec la membrane plasmique pour relarguer des particules de 50 à 100 nm appelées exosomes (Raposo *et al.*, 1996; Escola *et al.*, 1998). Les exosomes produits par les cellules B sont par exemple enrichis en tétraspanines CD37, CD53, CD63, CD81 et CD82 (Escola *et al.*, 1998). CD9 et CD81 sont aussi retrouvés dans les exosomes des cellules dendritiques (Morelli *et al.*, 2004).

III.3. Microdomaines enrichis en tétraspanines

Une caractéristique majeure des tétraspanines est leur capacité de s'associer entre elles ainsi qu'à d'autres molécules de surface, notamment des intégrines et des molécules de la superfamille des immunoglobulines, pour former le réseau des tétraspanines ("tetraspanin

web”) (Boucheix and Rubinstein, 2001). L’étude des complexes à tétraspanines repose notamment sur les techniques d’immunoprécipitation, à l’aide d’anticorps anti-tétraspanines et de différents détergents pour lyser les cellules. De manière remarquable, après lyse des cellules avec des détergents préservant les interactions entre tétraspanines (CHAPS, Brij96/97, Brij58, Brij99), le profil de molécules co-immunoprécipitées est identique d’une tétraspanine à l’autre, pour un type cellulaire donné (Rubinstein *et al.*, 1996; Serru *et al.*, 1999). Au contraire, le profil obtenu après lyse des cellules par la digitonine (et parfois le Triton X-100 ou le NP40), condition qui ne permet plus d’observer les interactions entre tétraspanines, comporte typiquement une seule tétraspanine et un nombre limité de molécules (Serru *et al.*, 1999). Ces observations sont à l’origine du modèle de la toile des tétraspanines (**Figure 14**). Selon ce modèle, les tétraspanines forment des complexes primaires avec d’autres molécules, dites **partenaires moléculaires**. Les interactions tétraspanine/tétraspanine permettent l’assemblage de ces complexes primaires en de larges complexes d’ordre supérieur constituant la toile des tétraspanines (Serru *et al.*, 1999). Les interactions entre tétraspanines se font au sein d’un environnement lipidique particulier, contenant du cholestérol et des gangliosides (Claas *et al.*, 2001; Charrin *et al.*, 2003b; Odintsova *et al.*, 2003; Delaguillaumie *et al.*, 2004). La toile des tétraspanines forme ainsi des **microdomaines membranaires**, qui sont physiquement et fonctionnellement distincts des radeaux lipidiques classiques (« rafts ») (Claas *et al.*, 2001).

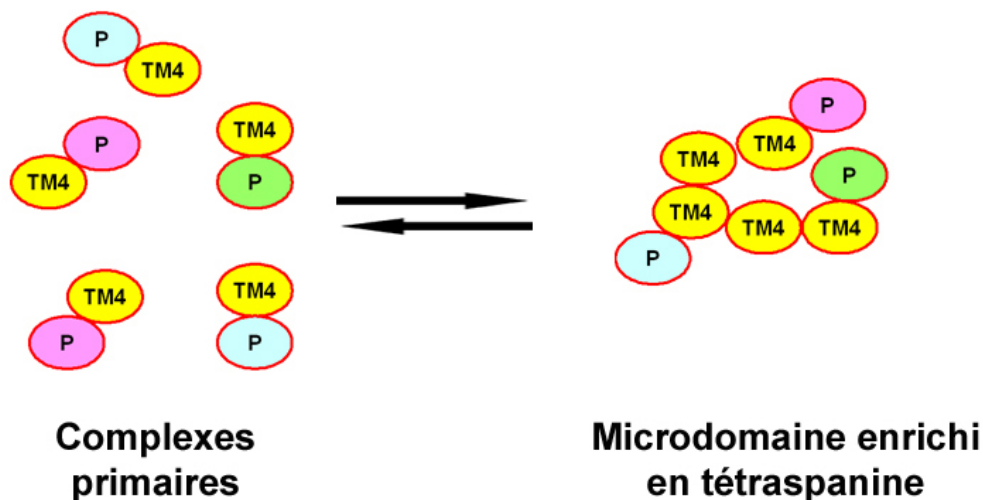


Figure 14. Organisation du réseau des tétraspanines. Chaque tétraspanine (TM4) a la capacité à former des complexes primaires avec un nombre limité de molécules dites partenaires moléculaires (P). Les tétraspanines peuvent également s’associer entre elles, assemblant les complexes primaires en de plus larges complexes multimoléculaires, qui constituent les microdomaines enrichis en tétraspanines.

III.3.1. Partenaires moléculaires des tétraspanines

Les interactions entre les tétraspanines et leurs partenaires moléculaires sont directes et hautement spécifiques (**Tableau 2**). Par exemple, les intégrines $\alpha 3\beta 1$ et $\alpha 6\beta 1$ s'associent directement à CD151 mais pas à d'autres tétraspanines (Yauch *et al.*, 1998; Serru *et al.*, 1999). EWI-F/CD9P-1 et EWI-2/PGRL, deux protéines de la superfamille des immunoglobulines récemment décrites, s'associent seulement aux tétraspanines CD9 et CD81 (Charrin *et al.*, 2001; Clark *et al.*, 2001; Stipp *et al.*, 2001b; Stipp *et al.*, 2001a; Charrin *et al.*, 2003c). D'autres complexes primaires sont par exemple CD81/CD19 sur les cellules lymphoïdes B (Bradbury *et al.*, 1992; Horvath *et al.*, 1998), ou encore CD81/intégrine $\alpha 4\beta 1$ sur les leucocytes (Serru *et al.*, 1999).

Tétraspanines	Partenaires
UP1a	-UPII
UP1b	-UPIII
CD9	-ProHB-EGF -EWI-F -EWI-2
CD63	-H,K-ATPase
CD81	-CD19 -Intégrine $\alpha 4\beta 1$ -EWI-F -EWI-2
CD151	-Intégrine $\alpha 3\beta 1$ -Intégrine $\alpha 6\beta 1$ -Intégrine $\alpha 6\beta 4$

Tableau 2. Partenaires moléculaires connus des tétraspanines. UP = uroplakine, HB-EGF = heparin binding EGF-like growth factor.

III.3.2. Microdomaines enrichis en tétraspanines

Les tétraspanines ont également la capacité de s'associer entre elles, permettant d'assembler plusieurs complexes primaires entre eux (Angelisova *et al.*, 1994; Berditchevski *et al.*, 1996; Rubinstein *et al.*, 1996). Les tétraspanines jouent ainsi le rôle d'organiseurs membranaires de larges complexes multimoléculaires formant la toile des tétraspanines (Rubinstein *et al.*, 1996; Serru *et al.*, 1999). Ces interactions moléculaires se font dans un environnement lipidique particulier. En effet, les tétraspanines colocalisent avec les gangliosides (Claas *et al.*, 2001; Odintsova *et al.*, 2003; Delaguillaumie *et al.*, 2004), notamment CD9 qui s'associe directement au ganglioside GM3 (Ono *et al.*, 2001), et plusieurs tétraspanines, incluant CD9, CD81 et CD82, s'associent directement au cholestérol membranaire (Charrin *et al.*, 2003b). De plus, plusieurs études ont montré que les complexes à tétraspanines sont distribués au moins en partie dans les fractions légères (riches en lipides) après centrifugation en gradient de sucrose, lorsque les cellules sont lysées dans des conditions qui préservent les interactions entre tétraspanines (Brij ou CHAPS par exemple) (Claas *et al.*, 2001; Charrin *et al.*, 2003b; Cherukuri *et al.*, 2004a; Cherukuri *et al.*, 2004b; Delaguillaumie *et al.*, 2004). Ces observations sont à l'origine du concept de microdomaines enrichis en tétraspanines. Ces microdomaines membranaires présentent des analogies avec les radeaux lipidiques conventionnels (« rafts »), par la présence de cholestérol et de gangliosides, et par leur capacité de flotter en gradient de sucrose. Cependant, les microdomaines à tétraspanines présentent des caractéristiques essentielles qui les distinguent des « rafts » classiques. Ils sont notamment en majeure partie dissociés lors de la lyse en Triton à 4°C, alors que les rafts sont typiquement résistants au Triton à 4°C (Claas *et al.*, 2001; Charrin *et al.*, 2003a). Au contraire, l'intégrité des microdomaines enrichis en tétraspanines est maintenue en Brij97 à 37°C, condition qui dissocie les rafts (Claas *et al.*, 2001; Charrin *et al.*, 2003a). De plus, les protéines classiquement associées aux rafts, comme les protéines membranaires à ancrage GPI ou la cavéoline, ne sont pas retrouvées dans les microdomaines à tétraspanines (Berditchevski *et al.*, 2002).

Les mécanismes d'interaction entre les tétraspanines restent mal caractérisés. Si la contribution du cholestérol membranaire à la formation des radeaux lipidiques « classiques » est bien connue, son rôle dans l'organisation des microdomaines à tétraspanines est

controversé (Claas *et al.*, 2001; Charrin *et al.*, 2003b). La palmitoylation, une modification post-traductionnelle consistant en l'ajout de palmitates, typiquement sur des cystéines intracellulaires juxtamembranaires, est un des facteurs favorisant les interactions entre tétraspanines. Plusieurs études ont montré que les tétraspanines sont palmitoylées sur plusieurs cystéines (Seehafer *et al.*, 1988; Levy *et al.*, 1991; Berditchevski *et al.*, 2002; Charrin *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002). Dans certaines conditions, des mutants de CD9 et de CD151 déficients en palmitoylation (par mutation des cystéines intracellulaires) s'associent de façon moins efficace aux autres tétraspanines, ce qui est en faveur d'un rôle de la palmitoylation dans les interactions entre tétraspanines (Berditchevski *et al.*, 2002; Charrin *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2004). Les résultats de deux études suggèrent que la palmitoylation de CD81 est un processus dynamique. La stimulation des lymphocytes B s'accompagne d'une augmentation de la palmitoylation de CD81 (Cherukuri *et al.*, 2004a), et l'association de CD81 avec l'isoforme ϵ de la protéine 14-3-3 n'intervient qu'en cas de stress oxydant, qui inhibe la palmitoylation de CD81 (Clark *et al.*, 2004).

Plusieurs observations ont amené le groupe de Hemler à proposer que la structure des microdomaines enrichis en tétraspanines repose sur des briques centrales constituées par des homodimères (et des hétérodimères) de tétraspanines (Hemler, 2003; Kovalenko *et al.*, 2004). Le cristal du domaine EC2 de CD81 analysé par Kitadokoro et coll. consistait en un dimère du domaine EC2 (Kitadokoro *et al.*, 2001). La structure de ce domaine comporte notamment une interface hydrophobe potentiellement impliquée dans des interactions CD81/CD81, sans que l'on puisse exclure que cette interface soit en fait impliquée dans d'autres types d'interaction *in vivo*. Une étude récente de modélisation de la molécule CD81 entière a d'ailleurs montré que cette interface hydrophobe serait en fait masquée, au moins en partie, par la petite boucle extracellulaire de CD81 (domaine EC1) (Seigneuret, 2006). Les travaux de Kovalenko et coll. ont mis en évidence que des homodimères CD9/CD9, CD81/CD81 et CD151/CD151, ainsi que des hétérodimères de tétraspanines, peuvent être observés après pontage covalent dans différents types cellulaires (Kovalenko *et al.*, 2004). Dans ce cadre, il est intéressant de noter que les tétraspanines RDS/périphérine et ROM-1 forment des homodimères, qui s'assemblent en tétramères et en structures plus complexes (Goldberg *et al.*, 1995).

Au niveau de l'urothélium, les tétraspanines UPIa et UPIb s'associent respectivement

avec les uroplakines UPII et UPIII, et des hétérodimères UPIa/UPII et UPIb/III s'associent en paires pour former des structures symétriques hexagonales contenant chacune six paires d'hétérodimères UPIa/UPII-UPIb/III (Min *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2005). Ces structures hexagonales constituent les plaques urothéliales caractéristiques de la surface de l'épithélium vésical (**Figure 15**). A l'heure actuelle, on ne sait pas si ce type d'organisation symétrique à la surface des cellules s'applique plus généralement aux autres types de microdomaines enrichis en tétraspanines.

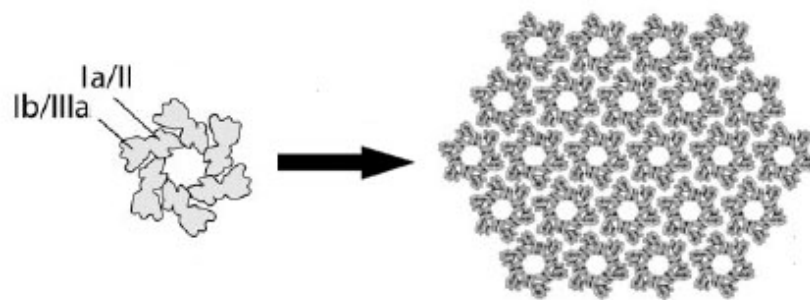


Figure 15. Modèle de l'assemblage des plaques urothéliales, tiré de (Hu *et al.*, 2005). Les tétraspanines UPIa et UPIb s'associent respectivement avec les uroplakines UPII et UPIII, et des hétérodimères UPIa/UPII et UPIb/III s'associent en paires pour former des structures symétriques hexagonales contenant chacune six paires d'hétérodimères. L'assemblage de ces structures hexagonales permet la formation des plaques urothéliales.

III.4. Fonction des tétraspanines

Les tétraspanines ont été impliquées dans divers processus biologiques, comme l'adhérence, la migration ou la fusion des cellules, des phénomènes de costimulation, de transduction de signal ou encore de différenciation, mais leur fonction précise reste inconnue (Boucheix and Rubinstein, 2001; Hemler, 2003; Levy and Shoham, 2005). Différentes approches ont été utilisées pour l'analyse de la fonction des tétraspanines, notamment l'utilisation d'anticorps anti-tétraspanines, la surexpression (par transfection) et l'inactivation de gène (knockout) chez la souris. Les effets induits par les anticorps anti-tétraspanines sont multiples et souvent spectaculaires. Souvent identiques d'une tétraspanine à l'autre, ces effets concernent en particulier l'adhérence homotypique (Masellis-Smith *et al.*, 1990), l'inhibition de la migration cellulaire (Miyake *et al.*, 1991; Rubinstein *et al.*, 1994; Jones *et al.*, 1996;

Cajot *et al.*, 1997; Lagaudriere-Gesbert *et al.*, 1997; Radford *et al.*, 1997; Yanez-Mo *et al.*, 1998; Stipp and Hemler, 2000), des effets antiprolifératifs (Oren *et al.*, 1990) ou de costimulation (Lagaudriere-Gesbert *et al.*, 1997). L'invalidation chez la souris du gène de plusieurs tétraspanines a révélé leur rôle dans l'activation des cellules du système immunitaire (Maecker and Levy, 1997; Miyazaki *et al.*, 1997; Tsitsikov *et al.*, 1997; Knobloch *et al.*, 2000; Tarrant *et al.*, 2002; van Spriël *et al.*, 2004; Wright *et al.*, 2004). Par ailleurs, les tétraspanines ont été impliquées dans différentes pathologies. Les tétraspanines jouent notamment un rôle dans la formation des métastases tumorales (Boucheix *et al.*, 2001), le plus souvent en tant que suppresseurs (Ikeyama *et al.*, 1993; Dong *et al.*, 1995; Radford *et al.*, 1995), mais parfois aussi en tant que promoteurs de métastases (Claas *et al.*, 1998). Des mutations dans certaines tétraspanines ont été associées à des maladies génétiques, notamment des cas de déficit mental lié au chromosome X (Zemni *et al.*, 2000) ou certaines formes de rétinite pigmentaire (Kohl *et al.*, 1997). Les tétraspanines sont également impliquées au cours de certaines infections ; ce point sera repris plus loin. Ici, nous nous intéresserons à trois aspects de la fonction des tétraspanines : le rôle des tétraspanines dans la régulation de la fonction de leurs partenaires, leur rôle dans des phénomènes de remaniement membranaire, et leur rôle potentiel comme récepteurs.

III.4.1. Rôle des tétraspanines dans la fonction de leurs partenaires

Les tétraspanines contribuent à réguler la fonction de leurs partenaires de plusieurs façons. Tout d'abord, elles peuvent jouer un rôle dans le trafic intracellulaire ou extracellulaire de ces molécules associées. Par exemple, CD81 est nécessaire à l'expression de son partenaire CD19 à la surface des lymphocytes B (Maecker and Levy, 1997; Miyazaki *et al.*, 1997; Tsitsikov *et al.*, 1997; Shoham *et al.*, 2003). En l'absence de CD81, on observe une réduction majeure du niveau d'expression de surface de CD19, associée à un blocage de la molécule au niveau du réticulum endoplasmique (Shoham *et al.*, 2003). La tétraspanine CD63, en s'associant à la sous-unité β de la H,K-ATPase, permet son internalisation dans les cellules pariétales de l'estomac (Duffield *et al.*, 2003). La tétraspanine CD9 est associée aux formes membranaires des ligands du récepteur de l'EGF (epidermal growth factor receptor, EGF-R), qui sont le pro-TGF (tumor growth factor)- α , le pro-HB-EGF et la pro-amphireguline. L'association à CD9 augmente l'activité de ces ligands dans les phénomènes

de signalisation juxtacrine (Higashiyama *et al.*, 1995; Inui *et al.*, 1997; Shi *et al.*, 2000), par un mécanisme non élucidé qui pourrait impliquer l'inhibition du clivage de ces ligands membranaires (Shi *et al.*, 2000). Cependant, une autre étude a mis en évidence que l'association de CD9 avec le pro-HB-EGF et la métalloprotéase ADAM10 augmente le clivage et le relargage de HB-EGF (Yan *et al.*, 2002).

Un deuxième mécanisme de régulation par les tétraspanines est la potentialisation des interactions de leurs partenaires moléculaires avec leurs ligands. Le premier exemple connu est celui de CD9, qui permet la fixation de la toxine diphtérique sur son récepteur, le proHB-EGF, qui est associé à CD9 (Iwamoto *et al.*, 1994). L'expression de CD9 augmente la sensibilité des cellules à l'action de la toxine en augmentant le nombre de sites fonctionnels du proHB-EGF, sans modifier le nombre total de molécules proHB-EGF à la surface des cellules (Iwamoto *et al.*, 1994). De plus, l'association à CD9 augmente l'activité juxtacrine de proHB-EGF (Higashiyama *et al.*, 1995). Cette activité facilitante de l'activité de proHB-EGF est spécifique de CD9, et n'est pas observée avec d'autres tétraspanines comme CD63, CD81 et CD82, auxquelles proHB-EGF est probablement indirectement associé via CD9 (Nakamura *et al.*, 2000). Un autre exemple est la tétraspanine CD151, qui s'associe aux intégrines $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$ et $\alpha 6\beta 4$. L'analyse de mutants a permis de mettre en évidence le rôle de CD151 dans la régulation de l'activité de ces intégrines. Par exemple, des mutations du site d'interaction de CD151 avec les intégrines $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, qui n'altèrent pas la capacité des cellules à adhérer au substrat, entraînent la perte de la capacité des cellules à s'étaler et à former des structures en câbles dans le Matrigel (Kazarov *et al.*, 2002). Des mutations dans l'extrémité cytoplasmique C-terminale de CD151 diminuent la force d'adhérence de l'intégrine $\alpha 6\beta 1$ sur son ligand, la laminine, ce qui se traduit par un retard de l'étalement des cellules sur ce substrat, ou encore par une inhibition de la formation de structures en câbles (Zhang *et al.*, 2002; Lammerding *et al.*, 2003). Il a été montré que l'association à CD151 stabilise la conformation active de l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ (Nishiuchi *et al.*, 2005). Enfin, l'association à CD81 facilite l'adhérence des cellules leucocytaires sur VCAM-1, en augmentant l'avidité d'interaction de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ pour VCAM-1, sans modifier l'affinité de l'intégrine pour son ligand (Feigelson *et al.*, 2003).

Enfin, les tétraspanines peuvent réguler des phénomènes de transduction de signal en aval de leurs molécules partenaires. A titre d'exemple, CD151 diminue l'activation de Ras dans les fibroblastes de rat en réponse à l'adhérence médiée par les intégrines (Sawada *et al.*, 2003).

III.4.2. Tétraspansines et remaniements membranaires

Plusieurs tétraspansines jouent un rôle dans des processus impliquant des phénomènes de remaniement membranaire. L'exemple le plus marquant est le rôle de CD9 dans la fusion des gamètes. En effet, l'invalidation du gène de CD9 induit une réduction majeure de la fertilité chez les souris femelles, sans autre anomalie évidente (Kaji *et al.*, 2000; Le Naour *et al.*, 2000; Miyado *et al.*, 2000). Cette infertilité est due à un défaut de fusion des ovocytes avec les spermatozoïdes. De plus, des anticorps anti-CD9 bloquent la fécondation des ovocytes normaux *in vitro* (Chen *et al.*, 1999; Le Naour *et al.*, 2000). Un motif SFQ présent dans la région variable du domaine EC2 de CD9 est nécessaire lors de la fusion des gamètes (Zhu *et al.*, 2002). Une forme recombinante du domaine EC2 de CD9 est capable de bloquer la fusion quand elle est incubée avec les ovocytes, qui expriment CD9, mais pas avec les spermatozoïdes. Cela suggère que CD9 n'interagit pas en *trans* avec un ligand des spermatozoïdes, mais intervient au cours de la fusion des gamètes en modulant en *cis* l'activité d'une molécule partenaire sur l'ovocyte (Zhu *et al.*, 2002).

CD81 est également exprimé par les ovocytes, et est aussi impliqué dans la fusion des gamètes. L'invalidation du gène de CD81 entraîne une réduction de la fertilité chez les souris femelles, liée à un défaut de fusion des gamètes (Deng *et al.*, 2000; Rubinstein *et al.*, In press), et des anticorps anti-CD81 ainsi que le domaine EC2 isolé de CD81 peuvent partiellement inhiber le processus de fusion (Takahashi *et al.*, 2001; Higginbottom *et al.*, 2003). L'injection d'ARNm codant CD81, bien que moins efficace que celle d'ARNm de CD9, permet cependant de restaurer partiellement la capacité d'ovocytes déficients en CD9 à fusionner avec les spermatozoïdes (Kaji *et al.*, 2002). Il est intéressant de noter que l'invalidation du gène de CD9 chez la souris ne supprime pas complètement la fertilité des femelles, alors que les souris doublement déficientes en CD9 et en CD81 sont totalement stériles (Rubinstein *et al.*, In press). L'ensemble de ces résultats suggère que CD9 et CD81 jouent des rôles complémentaires mais non redondants au cours de la fusion des gamètes.

Un rôle des tétraspansines a été décrit dans d'autres phénomènes de fusion cellulaire. Des études ont ainsi montré que des anticorps anti-CD81, anti-CD82 ou anti-CD9 inhibent la formation de syncytium induite par des virus (Fukudome *et al.*, 1992; Imai *et al.*, 1992; Willett *et al.*, 1997; Schmid *et al.*, 2000). De plus, des anticorps spécifiques de CD81 et CD9

bloquent la fusion des myoblastes, qui permet la formation des myotubes au cours de la différenciation musculaire, alors qu'au contraire la surexpression de CD9 augmente la formation de syncytium à partir de cellules de rhabdomyosarcome (Tachibana and Hemler, 1999). Une étude plus récente a montré que CD9 et CD81 jouent un rôle inhibiteur sur la fusion des macrophages (Takeda *et al.*, 2003), ce qui suggère que CD9 et CD81 ne participent pas directement à la fusion des membranes cellulaires, mais interviennent plutôt dans la régulation des phénomènes de fusion.

D'autres phénomènes de remaniement membranaire impliquent des tétraspanines. Par exemple, des anticorps anti-CD9 induisent des perturbations de la dynamique membranaire au cours de la différenciation des mégacaryocytes humains (Clay *et al.*, 2001). La dégranulation des mastocytes induite via le récepteur de haute affinité pour les immunoglobulines E (FcεRI) est inhibée par des anticorps anti-CD81 (Fleming *et al.*, 1997). Il a également été montré que l'engagement de CD82, en plus d'amplifier les signaux d'activation du récepteur des cellules T (TCR), induit l'adhérence, l'étalement et le développement d'extensions membranaires des lymphocytes T, par un mécanisme impliquant la polymérisation de l'actine et des Rho GTPases (Lagaudriere-Gesbert *et al.*, 1998; Delaguillaumie *et al.*, 2002). Enfin, comme mentionné plus haut, les tétraspanines sont enrichies dans les corps multivésiculaires et les exosomes (Escola *et al.*, 1998). L'ensemble de ces observations suggère que les microdomaines à tétraspanines pourraient constituer un environnement particulièrement favorable aux processus impliquant des remaniements membranaires, y compris la fusion.

III.4.3. Ligands des tétraspanines

S'il est clairement documenté que les tétraspanines s'associent latéralement avec diverses protéines membranaires (interactions en *cis*), il existe par contre peu de ligands connus pour interagir en *trans* avec les tétraspanines. L'exemple le mieux caractérisé est l'interaction de la glycoprotéine d'enveloppe E2 du VHC avec CD81 (Pileri *et al.*, 1998), qui implique notamment un acide aminé hydrophobe (F186) dans le domaine EC2 (Higginbottom *et al.*, 2000), équivalent au site SFQ du domaine EC2 de CD9, impliqué dans la fusion des gamètes (Zhu *et al.*, 2002). Le rôle de CD81 au cours de l'infection par le VHC est détaillé plus loin.

Un autre exemple de ligand est la protéine PSG17 (pregnancy-specific glycoprotein 17), une protéine soluble produite par le placenta et appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Chez la souris (mais pas chez l'homme), PSG17 interagit spécifiquement avec CD9 et inhibe la fusion des gamètes, et le site SFQ de CD9 est nécessaire à la fixation de PSG17 (Waterhouse *et al.*, 2002; Ellerman *et al.*, 2003). Enfin, il a récemment été montré que l'interleukine IL-16 est un ligand potentiel de CD9 (Qi *et al.*, 2005). Cependant, les résultats de cette étude ne permettent pas d'éliminer la possibilité que CD9 potentialise en fait la fixation de l'IL-16 sur les cellules en modulant la conformation et/ou l'activité du récepteur de l'IL-16 (IL-16R), comme pour la fixation de la toxine diphtérique sur le proHB-EGF associé à CD9 (Iwamoto *et al.*, 1994).

III.5. Tétraspansines et infections

III.5.1. CD81 et virus de l'hépatite C

L'exemple le mieux documenté du rôle des tétraspansines au cours des infections est celui de CD81 lors de l'infection par le virus de l'hépatite C (VHC). Le VHC est un petit virus à ARN enveloppé de la famille des *Flaviviridae*, dont le génome code une polyprotéine qui est clivée en protéines structurales et non structurales par des protéases cellulaires et virales. Les protéines structurales incluent les glycoprotéines d'enveloppe E1 et E2, qui permettent l'attachement du virus et l'entrée dans les cellules hôtes (Voisset and Dubuisson, 2004). CD81 a été initialement identifié comme pouvant fixer une forme soluble tronquée de la glycoprotéine E2 de certaines souches du VHC sur les cellules ((Pileri *et al.*, 1998). Le site d'interaction avec E2 est localisé dans la région variable du domaine EC2 de CD81 et implique notamment une phénylalanine en position 186 (Higginbottom *et al.*, 2000). L'interaction E2-CD81 est spécifique, puisque E2 ne se fixe pas sur CD9, CD63 ou CD151 (Flint *et al.*, 1999). Par la suite, l'utilisation de particules rétrovirales pseudotypées exprimant les glycoprotéines d'enveloppe du VHC (VHCpp) a permis de démontrer que CD81 est nécessaire à l'infection des cellules par les VHCpp. En effet, l'infectiosité des VHCpp peut être inhibée par des anticorps anti-CD81 (Bartosch *et al.*, 2003a; Bartosch *et al.*, 2003b; Hsu *et al.*, 2003), par une forme recombinante soluble du domaine EC2 de CD81 (Bartosch *et al.*, 2003a; Hsu *et al.*, 2003), ou par inhibition de l'expression de CD81 par siRNA (Zhang *et al.*,

2004; Lavillette *et al.*, 2005b). Au contraire, l'expression de CD81 confère la susceptibilité à l'infection par les VHCpp dans des cellules hépatocytaires n'exprimant pas CD81, comme les cellules HepG2 (Bartosch *et al.*, 2003b; Cormier *et al.*, 2004; McKeating *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2004). Une étude a montré que les anticorps anti-CD81 bloquent l'infection par les VHCpp à une étape qui suit l'attachement des particules virales aux cellules (Cormier *et al.*, 2004). Très récemment, plusieurs équipes ont réussi à produire des particules virales infectieuses *in vitro* dans des cellules hépatocytaires HuH7 transfectées de manière transitoire ou stable par un réplicon particulier du VHC (virus JFH-1) (Cai *et al.*, 2005; Lindenbach *et al.*, 2005; Wakita *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2005). L'infectiosité de ces particules virales peut être inhibée par des anticorps anti-CD81 (Cai *et al.*, 2005; Wakita *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2005) ou par une forme soluble du domaine EC2 de CD81 (Lindenbach *et al.*, 2005), et l'expression de CD81 est nécessaire pour l'infection des cellules HepG2 par ces virions (Lindenbach *et al.*, 2005). Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment avec des pseudoparticules et démontrent le rôle de CD81 au cours de l'infection par des virions du VHC.

Si CD81 a initialement été proposé comme récepteur permettant l'entrée du VHC dans les cellules, son rôle exact au cours de l'entrée du virus n'est pas clair. Tout d'abord, il faut noter qu'alors que l'expression de CD81 humain est suffisante pour permettre la fixation de E2, elle n'est pas suffisante pour permettre l'infection par le VHC. En particulier, les hépatocytes de tamarins ou de souris transgéniques pour CD81 humain fixent E2 mais ne permettent pas l'infection par le VHC (Allander *et al.*, 2000; Masciopinto *et al.*, 2002). Ces résultats suggèrent que d'autres facteurs sont nécessaires pour permettre l'entrée du virus dans les cellules. Par ailleurs, on observe des différences dans la capacité de E2 à fixer CD81 en fonction des souches de virus (Roccasecca *et al.*, 2003; Shaw *et al.*, 2003; Kronenberger *et al.*, 2004; McKeating *et al.*, 2004). Par exemple, alors que E2 des VHC de sous-type 1a se fixe avec une forte affinité à CD81, E2 des virus de sous-type 1b présente une affinité d'interaction beaucoup plus faible pour CD81. La mutation de la phénylalanine en position 186 dans le domaine EC2 de CD81 supprime l'interaction avec E2 de la souche H du VHC (sous-type 1a), mais n'a pourtant aucun effet sur l'infection des HepG2/CD81 par des pseudoparticules exprimant E2 de la souche H du VHC (Zhang *et al.*, 2004). Une autre étude a montré que les différents sous-types de VHCpp infectent les cellules hépatocytaires de façon CD81-dépendante, y compris les sous-types du VHC pour lesquels E2 n'interagit pas

(ou très peu) avec CD81 *in vitro* (McKeating *et al.*, 2004). Il n'y a donc pas de corrélation pour une souche virale donnée entre la capacité de E2 à interagir avec CD81 *in vitro* et la dépendance vis-à-vis de CD81 de l'infection des cellules. On peut d'ailleurs noter que le faible degré d'internalisation observée après engagement de CD81 par E2 suggère que CD81 seul n'est pas suffisant pour permettre l'endocytose du virus (Petracca *et al.*, 2000).

La glycoprotéine d'enveloppe E2 du VHC se fixe également sur le récepteur scavenger de type B1 (SR-B1) sur les cellules (Scarselli *et al.*, 2002). L'infectiosité des VHCpp peut être inhibée par des anticorps anti-SR-B1 (Bartosch *et al.*, 2003b) ou par inhibition de l'expression de SR-B1 par siRNA (Lavillette *et al.*, 2005b). Dans les hépatocytes, SR-B1 fonctionne comme un récepteur des lipoprotéines, et est responsable de l'extraction sélective des esters de cholestérol des HDL (high-density lipoproteins) (Connelly and Williams, 2004). Il a récemment été montré que les HDL augmentent l'entrée des VHCpp dans les cellules Huh-7, par un mécanisme dépendant de SR-B1 (Voisset *et al.*, 2005). Les lipoprotéines de faible densité (lowdensity lipoproteins, LDL) et les apolipoprotéines des HDL seules n'ont par contre aucun effet sur l'infection. Par ailleurs, le récepteur aux LDL pourrait faciliter l'internalisation des virions du VHC associés aux LDL (Agnello *et al.*, 1999), mais il ne semble pas jouer un rôle majeur dans l'infection par les VHCpp (Bartosch *et al.*, 2003a).

Il est intéressant de noter que les types cellulaires susceptibles à l'infection par les VHCpp sont tous d'origine hépatique, et expriment CD81 et SR-B1 (Bartosch *et al.*, 2003b). Par contre, d'autres types cellulaires exprimant à la fois CD81 et SR-B1 mais d'origine non-hépatique ne sont pas infectables par les VHCpp (Bartosch *et al.*, 2003b; Hsu *et al.*, 2003), ce qui suggère que d'autres molécules, exprimées spécifiquement par les cellules hépatocytaires, sont nécessaires à l'entrée du virus.

L'interaction de E2 avec CD81 exprimé sur les cellules du système immunitaire pourrait par ailleurs induire des modulations des réponses immunitaires par le VHC. Ainsi, la fixation de E2 à CD81 bloque l'activation des cellules NK *in vitro* (Crotta *et al.*, 2002; Tseng and Klimpel, 2002), suggérant une stratégie d'échappement du virus aux réponses de l'hôte. Par ailleurs, la fixation de E2 à CD81, en induisant une activation des lymphocytes B, pourrait participer au développement de certains syndromes lymphoprolifératifs B associés à l'infection par le VHC (Quinn *et al.*, 2001).

III.5.2. Autres infections

Des études reposant notamment sur l'utilisation d'anticorps anti-tétraspanines ont permis de mettre en évidence le rôle de certaines tétraspanines au cours d'autres infections virales. CD9 a été impliqué dans la susceptibilité à l'infection par le virus de l'immunodéficience féline (FIV) (Willett *et al.*, 1994). Les anticorps anti-CD9 inhibent la production de virions du FIV, par un mécanisme agissant après l'entrée du virus (de Parseval *et al.*, 1997; Willett *et al.*, 1997). Les anticorps anti-CD9 inhibent aussi l'infection par le virus CDV (Canine Distemper Virus), un morbillivirus qui infecte les canidés (Loffler *et al.*, 1997). Ils inhibent la fusion cellule-cellule induite par ce virus, mais pas la fusion virus-cellule (Schmid *et al.*, 2000). D'autre part, les protéines d'enveloppe et la protéine de matrice de HTLV (Human T Cell Leukemia)-1 sont associées à CD82 (Pique *et al.*, 2000; Mazurov *et al.*, 2005). Des anticorps anti-CD81 et anti-CD82 ou la surexpression de CD82 avec les glycoprotéines d'enveloppe de HTLV-1 inhibent la formation de syncytium induite par ce virus et impliquée dans la transmission du virus de cellule à cellule (Imai and Yoshie, 1993; Pique *et al.*, 2000). Des anticorps anti-CD63 (mais pas anti-CD9, anti-CD81 ni anti-CD82) bloquent l'infection des macrophages (mais pas des cellules T) par le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 (VIH-1), par un mécanisme agissant après la fusion du virus avec la cellule (von Lindern *et al.*, 2003). Dans les macrophages, les virions du VIH-1 s'accumulent dans les endosomes tardifs, qui sont enrichis en tétraspanines (Pelchen-Matthews *et al.*, 2003). De plus, CD81 est associé à CD4 (Imai and Yoshie, 1993; Imai *et al.*, 1995) et participe à des phénomènes de co-stimulation des cellules T qui augmentent la transcription et la production virale du HIV-1 dans les cellules infectées (Tardif and Tremblay, 2005). D'autre part, la protéine de matrice de HTLV-1 est associée aux microdomaines enrichis en tétraspanines, qui pourraient être impliqués dans la transmission des virions de HTLV-1 (Mazurov *et al.*, 2005).

Comme nous l'avons vu plus haut, CD9 pourrait aussi participer à la pathogénie de la diphtérie. En effet, CD9 est associé au récepteur de la toxine diphtérique qui est le précurseur du facteur de croissance heparin-binding-EGF (proHB-EGF). L'expression de CD9 à la surface de cellules exprimant proHB-EGF entraîne une augmentation du nombre de sites pour la toxine diphtérique alors que le nombre de molécules HB-EGF reste constant et que l'affinité n'est pas modifiée (Iwamoto *et al.*, 1994). Il est possible que CD9 modifie la

conformation du proHB-EGF et démasque ainsi de nouveaux sites de fixation pour la toxine, ou concentre ce récepteur au sein des microdomaines enrichis en tétraspanines et permette ainsi des interactions de forte avidité avec la toxine diphtérique.

Enfin, une protéine appartenant à la superfamille des tétraspanines a été identifiée chez quatre espèces de champignons phytopathogènes (Gourgues *et al.*, 2002). Cette tétraspanine est impliquée dans l'invasion des tissus de la plante par ces champignons, qui se fait grâce à une structure spécialisée appelée *appressorium* (Clergeot *et al.*, 2001; Gourgues *et al.*, 2004; Veneault-Fourrey *et al.*, 2005). La tétraspanine n'est pas nécessaire à la formation de l'*appressorium*, mais est impliquée dans des processus de remaniement membranaire au niveau de l'*appressorium*, nécessaires à la colonisation de la plante par le champignon (Veneault-Fourrey *et al.*, 2005).

RESULTATS

Jusqu'à présent, les mécanismes moléculaires de l'invasion des hépatocytes par les sporozoïtes de *Plasmodium* sont restés très peu caractérisés. En particulier, les récepteurs hépatocytaires permettant la pénétration des parasites n'ont pas été identifiés. L'invasion des sporozoïtes s'accompagne de la formation d'une vacuole parasitophore, un compartiment membranaire particulier issu au moins en partie de la membrane plasmique de la cellule. La formation de cette vacuole implique probablement d'importants remaniements membranaires à la surface de la cellule au moment de l'entrée du parasite. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les tétraspanines jouent un rôle au cours de différents processus impliquant des remaniements membranaires. De plus, les tétraspanines participent à certains processus infectieux, notamment CD81, qui est nécessaire à l'infection des hépatocytes par le virus de l'hépatite C. Ces différentes considérations nous ont poussés à nous intéresser au rôle possible des tétraspanines au cours de l'infection des hépatocytes par les sporozoïtes de *Plasmodium*. Nous avons plus particulièrement étudié le rôle de deux tétraspanines, CD9 et CD81, pour lesquelles nous disposons d'outils expérimentaux incluant des souris déficientes (knockout) et des anticorps monoclonaux, au cours de l'infection par les sporozoïtes du parasite humain *P. falciparum* et des parasites de rongeurs *P. yoelii* et *P. berghei*.

Rôle de CD81 au cours de l'infection par *Plasmodium*.

Article 1 :

Hepatocyte CD81 is required for *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium yoelii* sporozoite infectivity.

Olivier Silvie, Eric Rubinstein, Jean-François Franetich, Michel Prenant, Elodie Belnoue, Laurent Rénia, Laurent Hannoun, Wijnand Eling, Shoshana Levy, Claude Boucheix et Dominique Mazier.

Nature Medicine, **9**(1): 93-96 (2003).

Article 2 :

Expression of human CD81 differently affects host cell susceptibility to malaria sporozoites depending on the *Plasmodium* species.

Olivier Silvie, Céline Greco, Jean-François Franetich, Anne Dubart-Kupperschmitt, Laurent Hannoun, Geert-Jan van Gemert, Robert W. Sauerwein, Shoshana Levy, Claude Boucheix, Eric Rubinstein, Dominique Mazier.

Accepté pour publication dans *Cellular Microbiology*.

Afin de déterminer si les tétraspanines peuvent jouer un rôle au cours de l'infection par *Plasmodium*, nous avons tout d'abord analysé l'infection de souris déficientes en CD81 (cd81-/-) (Maecker and Levy, 1997) ou en CD9 (cd9-/-) (Le Naour *et al.*, 2000) par le parasite de rongeur *P. yoelii* (souche 265BY), en comparaison avec des souris de phénotype sauvage (wt, wild type). Après injection intraveineuse de sporozoïtes de *P. yoelii*, les souris cd9-/- comme les souris wt ont développé une infection des globules rouges, démontrant un développement hépatique complet du parasite. Par contre, aucune des souris cd81-/- n'a développé de parasitémie après injection intraveineuse de sporozoïtes (**Article 1, Tableau 1**). **Les souris cd81-/- sont donc réfractaires à l'infection *in vivo* par les sporozoïtes de *P. yoelii*.** Elles restent cependant sensibles à l'inoculation par des globules rouges infectés, qui court-circuite la phase hépatique (**Article 1, Tableau 1**). Ces résultats montrent que CD81 n'est pas nécessaire à l'infection des globules rouges par *P. yoelii*, en accord avec l'absence d'expression érythrocytaire de CD81, et suggèrent un défaut d'infection des hépatocytes (invasion et/ou développement hépatique du parasite).

Pour mieux caractériser le rôle de CD81, nous avons utilisé un modèle d'infection *in vitro* mis au point au laboratoire (Mazier *et al.*, 1982; Mazier *et al.*, 1984). Des cultures primaires d'hépatocytes de souris ou d'hépatocytes humains ont été inoculées respectivement avec des sporozoïtes de *P. yoelii* ou de *P. falciparum*, et analysées après 24 à 48 h de culture pour *P. yoelii*, ou 3 à 4 jours pour *P. falciparum*. Nous avons pu observer que les schizontes hépatiques de *P. yoelii* se développent aussi bien dans les hépatocytes wt que les hépatocytes cd9-/. **Par contre, aucun schizonte de *P. yoelii* n'a pu être observé dans les hépatocytes cd81-/- *in vitro* (Article 1, Figure 1),** à l'exception d'un parasite. De manière tout à fait inhabituelle, ce schizonte était localisé non pas dans le cytoplasme de la cellule infectée, près du noyau de la cellule, mais à l'intérieur du noyau de la cellule (**Figure 16**).

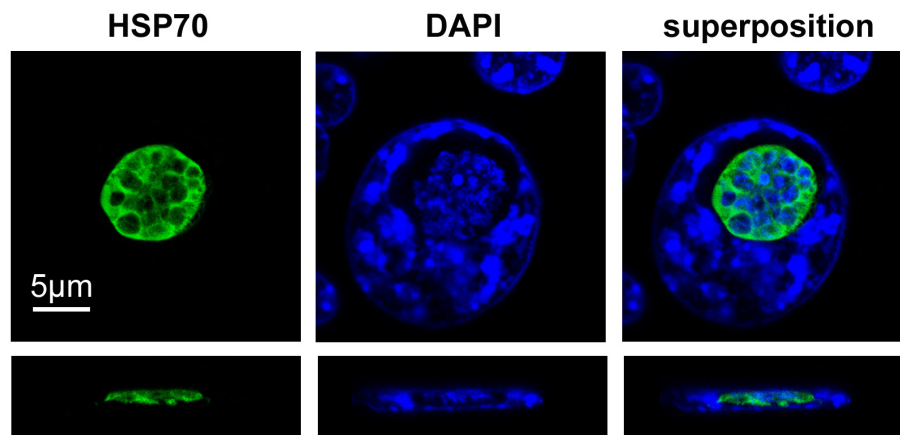


Figure 16. Schizonte de *P. yoelii* marqué par anticorps anti-HSP70 (en vert) à l'intérieur du noyau (marqué par DAPI, en bleu) d'un hépatocyte de souris cd81^{-/-}, observé en microscopie confocale. Les images supérieures correspondent à un plan xy alors que les images inférieures correspondent à un plan xz. Ce schizonte est le seul que nous ayons observé *in vitro* dans les hépatocytes cd81^{-/-}.

Nous avons ensuite testé la capacité d'anticorps monoclonaux anti-CD81 et anti-CD9 à bloquer l'infection par *P. yoelii* et *P. falciparum* (souche NF54). Les résultats ont montré que **des anticorps anti-CD81 mais pas anti-CD9 bloquent *in vitro* l'infection des hépatocytes de souris par *P. yoelii*, et des hépatocytes humains par *P. falciparum* (Article 1, Figures 1b et 2a)**. L'ajout d'anti-CD81 après la phase d'invasion (en pratique 3 heures après l'inoculation des sporozoïtes, période pendant laquelle les sporozoïtes migrent puis infectent les cellules, de manière asynchrone) n'a pas d'effet sur l'infection (Article 1, Figure 2b), ce qui suggère que CD81 est impliqué lors de la pénétration des sporozoïtes. Effectivement, en utilisant une technique de marquage différentiel des sporozoïtes intra et extracellulaires (Renia *et al.*, 1988; Silvie *et al.*, 2002), nous avons pu mettre en évidence un **défaut majeur de pénétration des sporozoïtes de *P. yoelii* dans les hépatocytes cd81^{-/-} (Article 1, Figure 1c)**, et confirmer que **les anti-CD81 inhibent la pénétration des sporozoïtes de *P. falciparum* dans les hépatocytes humains (Article 1, Figure 2c)**.

Il est important de noter que **l'inhibition de l'expression de CD81 (mais pas celle de CD9) dans les hépatocytes primaires humains**, par interférence à ARN (siRNA, small interfering RNA), **inhibe l'infection par les sporozoïtes de *P. falciparum* (voir Article 3, Figure XX A-B)**.

Les sporozoïtes peuvent pénétrer les cellules cibles selon deux modes distincts : soit par effraction de la membrane plasmique de la cellule, suivie de la migration du parasite à travers la cellule, soit par formation de la vacuole parasitophore, au sein de laquelle le sporozoïte se différencie en schizonte hépatique (Mota *et al.*, 2001b). Ces deux modes d'invasion peuvent être différenciés grâce à l'utilisation de marqueurs macromoléculaires de type dextran couplés à un fluorochrome (Mota *et al.*, 2001b). Les cellules sont normalement imperméables à ce type de marqueurs, sauf en cas de pénétration d'un sporozoïte par effraction membranaire. Après inoculation de sporozoïtes en présence de dextran fluorescent, les cellules positives en fluorescence correspondent aux cellules traversées, alors que les cellules infectées par formation d'une vacuole parasitophore sont négatives en fluorescence (Mota *et al.*, 2001b). En utilisant cette technique, nous avons observé un nombre similaire de cellules dextran-positives dans les hépatocytes primaires de souris wt et cd81^{-/-} infectés par des sporozoïtes de *P. yoelii* (**Article 1, Figure 1d-e**). De plus, les anticorps anti-CD81 n'ont aucun effet sur le nombre de cellules dextran-positives dans des cultures d'hépatocytes primaires humains infectés par des sporozoïtes de *P. falciparum*. Au cours des premières heures après inoculation de sporozoïtes de *P. yoelii*, la quasi-totalité des hépatocytes cd81^{-/-} contenant un parasite étaient dextran-positifs, alors qu'une large majorité d'hépatocytes wt contenant un parasite étaient au contraire dextran-négatifs, résultat d'une invasion par formation d'une vacuole, sans effraction membranaire. **Ces résultats montrent que CD81 n'est pas impliqué dans la migration des sporozoïtes à travers les cellules, mais est en revanche nécessaire au mode d'invasion par formation d'une vacuole parasitophore, elle-même indispensable à la différenciation des mérozoïtes potentiellement pathogènes.**

Afin de déterminer si CD81 peut jouer un rôle de récepteur pour *P. yoelii* et *P. falciparum*, nous avons produit des formes solubles des domaines EC2 de CD81 murin et CD81 humain fusionnés à la glutathion S transférase (GSTmCD81EC2 et GSThCD81EC2). Ces protéines sont reconnues par différents anticorps anti-CD81, ce qui indique que la conformation du domaine EC2 de CD81 est au moins partiellement conservée dans les protéines de fusion. Lorsque des hépatocytes primaires murins ou humains ont été infectés respectivement par des sporozoïtes de *P. yoelii* ou de *P. falciparum* **en présence de GSTmCD81EC2 ou de GSThCD81EC2, nous n'avons observé aucune inhibition de l'infection, même à des concentrations élevées des protéines de fusion (100µg/ml).** Nous

avons aussi recherché une interaction de ces protéines de fusion avec les sporozoïtes, par immunofluorescence, ou avec des protéines extraites de *P. yoelii* et *P. falciparum*, par far western blot et SELDI-TOF (Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight). **Aucune de ces techniques n'a permis de mettre en évidence une interaction entre le domaine EC2 de CD81 et les parasites.** Ces résultats suggèrent que CD81 ne jouerait pas un rôle de récepteur pour le parasite mais interviendrait de manière indirecte.

Nous avons également testé le rôle de CD81 au cours de l'infection par *P. berghei* (souche NK65), un autre parasite de rongeurs. Toutes les souris *cd81*^{-/-} inoculées avec des sporozoïtes de *P. berghei* ont développé une parasitémie, sans délai significatif par rapport aux souris *wt*. De plus, les hépatocytes *cd81*^{-/-} permettent le développement de formes exo-érythrocytaires de *P. berghei*, bien que de manière reproductible nous ayons observé une réduction du nombre de schizontes en comparaison aux hépatocytes *wt in vitro* (**Figure 17**). Par ailleurs, l'infection des hépatocytes de souris par les sporozoïtes de *P. berghei* est partiellement inhibée par des anticorps anti-CD81 (**Figure 17**). **Ces résultats montrent que CD81 n'est pas indispensable mais pourrait participer à l'infection des hépatocytes de souris par *P. berghei*.** On pouvait s'attendre à ce que CD81 ne soit pas indispensable à l'infection par *P. berghei*, car les sporozoïtes de *P. berghei* infectent très bien les cellules d'hépatocarcinome HepG2 (Hollingdale *et al.*, 1983), qui pour la plupart des clones utilisés dans les laboratoires n'expriment pas CD81 (Berditchevski *et al.*, 1996; Charrin *et al.*, 2001).

Il est classiquement admis que contrairement à *P. berghei*, les sporozoïtes de *P. falciparum* et de *P. yoelii* n'infectent pas les cellules HepG2 (Hollingdale *et al.*, 1984; Mazier *et al.*, 1985; Calvo-Calle *et al.*, 1994). En fait, on peut de manière reproductible observer quelques formes exo-érythrocytaires de *P. yoelii* ou *P. falciparum* dans les cellules HepG2, mais tous les parasites sont alors localisés dans le noyau des cellules infectées, et présentent un degré de maturation assez limité (**Article 2, Figure 3**). Nous avons pu montrer que ces schizontes proviennent en fait du développement intranucléaire de sporozoïtes en cours de migration, ayant pénétré la cellule par effraction membranaire, sans formation d'une vacuole parasitophore (**Article 2, Figures 7-9**). Ces formes intranucléaires ne sont pas observées dans les hépatocytes primaires (à l'exception d'un schizonte de *P. yoelii* trouvé dans le noyau d'un hépatocyte de souris *cd81*^{-/-}). Ces formes intranucléaires ne sont donc pas représentatives du processus normal d'infection, qui se fait par formation d'une vacuole

parasitophore. Dans les cellules d'hépatome de souris Hepa1-6, qui sont infectables par les sporozoïtes de *P. yoelii* selon une voie dépendante de CD81 (**Article 2, Figure 4**), on observe aussi des formes intranucléaires, qui représentent jusqu'à 25 % des schizontes (**Article 2, Figure 5 A**) et sont indépendantes de la présence de CD81.

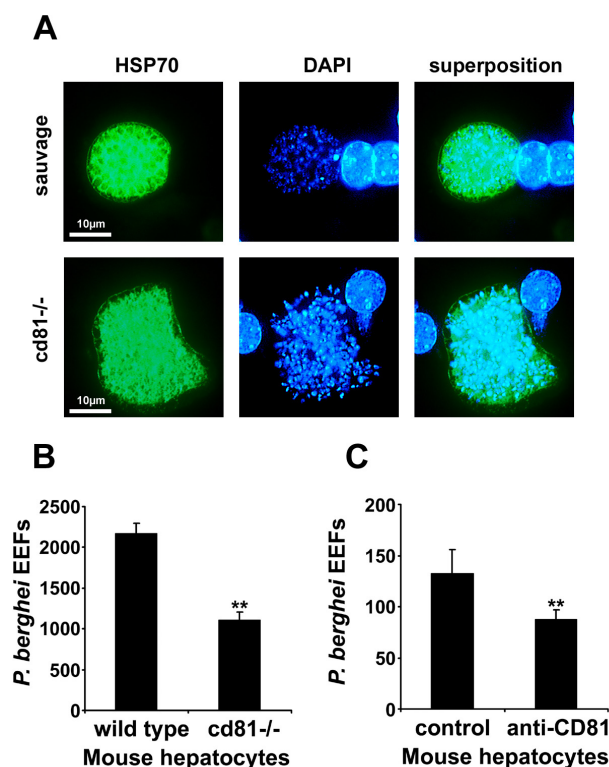


Figure 17. A. Schizontes hépatiques de *P. berghei* dans des hépatocytes primaires de souris sauvage (en haut) ou cd81^{-/-} (en bas), marqués par anticorps anti-HSP70 (en vert) et DAPI (en bleu) 48 heures post-infection. B. Nombre de schizontes hépatiques (exoerythrocytic forms, EEFs) de *P. berghei* dans des hépatocytes primaires de souris sauvage ou cd81^{-/-}, 48 heures post-infection. C. Nombre de schizontes hépatiques (exoerythrocytic forms, EEFs) dans des hépatocytes primaires murins normaux 48 heures après inoculation de sporozoïtes de *P. berghei* en présence d'anticorps anti-CD81 de souris (MT81 à 25µg/ml). **, p<0.01.

L'absence d'infection des cellules HepG2 (d'origine humaine) par les sporozoïtes de *P. yoelii* (parasite de rongeurs) n'est pas due à une barrière d'espèce, car les sporozoïtes de *P. yoelii* sont parfaitement capables d'infecter des hépatocytes primaires humains (**Article 2, Figure 1**). De plus l'expression transgénique de CD81 humain chez les souris déficientes en CD81 murin rétablit l'infectabilité de ces souris par les sporozoïtes de *P. yoelii*, aussi bien *in*

vivo qu'*in vitro* (**Article 2, Figure 2**). A la différence de *P. yoelii*, les sporozoïtes de *P. falciparum* n'infectent pas les hépatocytes primaires de souris (**Article 2, Figure 1**), ce qui montre qu'il existe une barrière d'espèce dans le cas du parasite humain. De plus, l'expression de CD81 humain chez les souris transgéniques n'est pas suffisante pour permettre l'infection des hépatocytes de souris par *P. falciparum in vitro* (**Article 2, Figure 1**).

Afin de déterminer si l'incapacité des sporozoïtes de *P. yoelii* et de *P. falciparum* à infecter les cellules HepG2 par formation d'une vacuole parasitophore est due à l'absence d'expression de CD81, nous avons analysé l'effet de l'expression de CD81 dans ces cellules. Nous avons utilisé deux lignées de cellules HepG2 exprimant de façon stable CD81 humain (HepG2/CD81). L'obtention de très nombreux schizontes cytoplasmiques après infection de ces cellules par des sporozoïtes de *P. yoelii* (**Article 2, Figure 6**) démontre que **l'expression de CD81 dans les cellules HepG2 est suffisante pour permettre l'infection par les sporozoïtes de *P. yoelii***. Ces cellules sont même beaucoup plus sensibles à l'infection que les cellules Hepa1-6, et constituent donc désormais un modèle idéal pour l'étude *in vitro* de l'infection par *P. yoelii*.

Contrairement à *P. yoelii*, les sporozoïtes de *P. falciparum* ne sont pas capables d'infecter les cellules HepG2/CD81 en formant une vacuole parasitophore (**Article 2, Figure 9**), même lorsque CD81 est exprimé à un niveau élevé comme dans les HepG2/CD81⁺⁺. Cela démontre que **CD81 n'est pas suffisant pour l'infection par les sporozoïtes de *P. falciparum***, et suggère que d'autres molécules sont nécessaires, exprimées dans les hépatocytes primaires humains mais pas dans les cellules HepG2.

Il est intéressant de noter que l'infection par les sporozoïtes de *P. berghei* reste indépendante de CD81 dans les cellules HepG2/CD81, car l'infection n'est inhibée ni par les anticorps anti-CD81 ni par siRNA ciblant CD81 (**Figure 18 A-B**). Par contre, de manière étonnante, nous avons trouvé que l'infection des cellules Hepa1-6 par les sporozoïtes de *P. berghei* dépend de CD81, car l'infection peut être presque totalement bloquée par un anticorps anti-CD81 (**Figure 18 C**). L'inhibition d'expression de CD81 à la surface des Hepa1-6 par deux oligonucléotides siRNA différents (**Figure 18 D**) inhibe l'infection par les sporozoïtes non seulement de *P. yoelii* mais aussi de *P. berghei* (**Figure 18 E-F**).

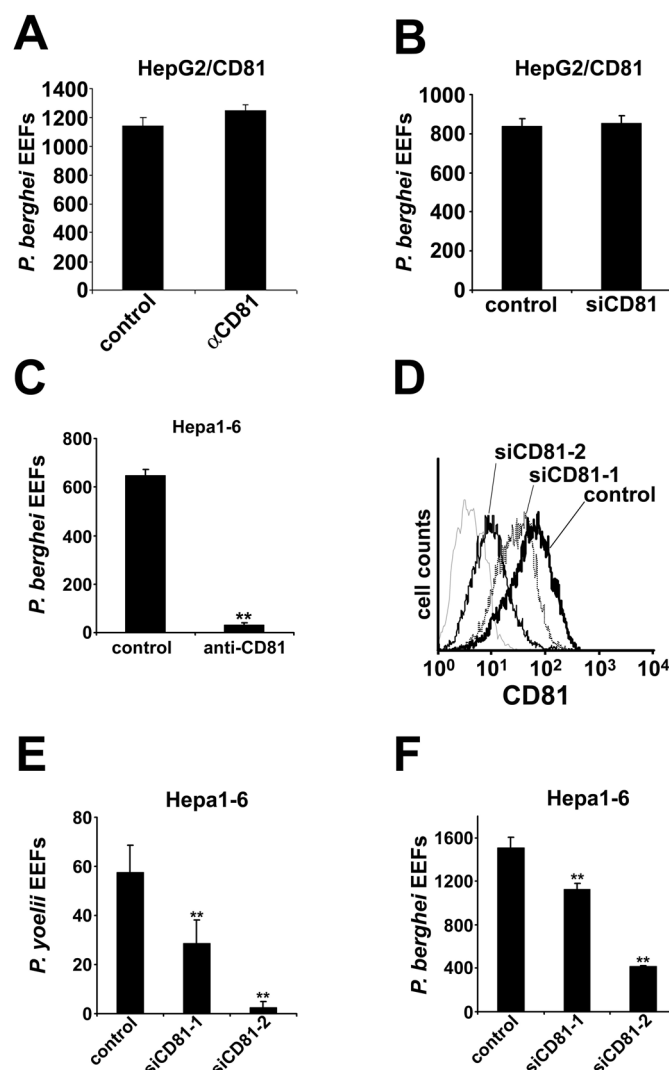


Figure 18. A-B. Effets de l'anticorps anti-CD81 humain TS81 (Charrin *et al.*, 2001) à 25µg/ml (A) et d'un duplex siRNA ciblant CD81 humain (B) sur l'infection des cellules HepG2/CD81 par les sporozoïtes de *P. berghei* (souche ANKA). C Effets de l'anticorps anti-CD81 murin MT81 (voir article 3) à 25µg/ml sur l'infection des cellules Hepa1-6 par les sporozoïtes de *P. berghei*. D. Analyse par FACS de l'expression de CD81 (marquage MT81) à la surface de cellules Hepa1-6 transfectées par deux duplex siRNA ciblant mCD81, en comparaison à un duplex siRNA contrôle. E-F. Effets des deux duplex siRNA ciblant mCD81 sur l'infection des cellules Hepa1-6 par les sporozoïtes de *P. yoelii* (E) ou *P. berghei* (F) **, $p < 0.01$.

En résumé, l'expression de CD81 est nécessaire à l'infection par les sporozoïtes de *P. yoelii* dans toutes les cellules testées (hépatocytes, Hepa1-6, HepG2/CD81) et est suffisante pour rendre les cellules HepG2 sensibles à l'infection par *P. yoelii*. CD81 est nécessaire à l'infection des hépatocytes humains par *P. falciparum* mais ne suffit pas à conférer la

susceptibilité à ce parasite dans les cellules HepG2. Enfin, selon le type de cellules cibles, l'infection par les sporozoïtes de *P. berghei* se fait soit par une voie CD81-indépendante (cas des cellules HepG2), soit par une voie CD81-dépendante (cas des cellules Hepa1-6), soit par deux voies distinctes CD81-dépendante et CD81-indépendante (cas des hépatocytes primaires de souris).

Rôle des microdomaines enrichis en tétraspanines au cours de l'infection par les sporozoïtes de *Plasmodium*.

Article 3 :

Cholesterol contributes to the organization of tetraspanin-enriched microdomains and to CD81-dependent infection by malaria sporozoites.

Olivier Silvie, Stéphanie Charrin, Martine Billard, Jean-François Franetich, Krista L. Clark, Geert-Jan van Gemert, Robert W. Sauerwein, François Dautry, Claude Boucheix, Dominique Mazier et Eric Rubinstein.

Soumis.

Afin de développer de nouveaux outils pour l'étude des tétraspanines chez la souris, nous avons produit des anticorps monoclonaux chez le rat immunisé contre des complexes à tétraspanines de souris. Parmi les clones obtenus, nous avons pu sélectionner **deux nouveaux anticorps monoclonaux anti-CD81 de souris**, appelés **MT81** (Mouse Tetraspanin CD81) et **MT81w** (Mouse Tetraspanin CD81 « Web ») (**Article 3, Figures 1-3**). MT81w n'est capable de précipiter CD81 que dans les conditions préservant les interactions entre tétraspanines (**Article 3, Figure 4A**). Des expériences d'immunodéplétion des complexes à tétraspanines ont permis de confirmer que MT81w ne reconnaît que CD81 associé au réseau des tétraspanines (**Article 3, Figure 4B**). **MT81w constitue donc un outil unique pour l'étude de l'association de CD81 aux microdomaines à tétraspanines.**

Notamment, en utilisant ce nouvel anticorps, nous avons pu mettre en évidence qu'**une fraction importante de CD81 est engagée dans la toile des tétraspanines dans les cellules hépatocytaires, en comparaison à d'autres types cellulaires** (**Article 3, Figure 3**), et que le cholestérol membranaire joue un rôle important dans la localisation de CD81 au sein des microdomaines à tétraspanines (**Article 3, Figures 5-6**). En particulier, la déplétion du cholestérol membranaire par la méthyl beta cyclodextrine (M β CD) réduit de façon réversible le niveau de fixation de MT81w aux cellules. Au contraire, l'apport de cholestérol aux cellules (par ajout de complexes M β CD/cholestérol préformés) augmente le niveau de marquage de MT81w.

Par ailleurs, MT81w inhibe l'infection des Hepa1-6 et des hépatocytes de souris par *P. yoelii* *in vitro*, ce qui démontre que les molécules de CD81 associées aux microdomaines participent à l'infection (**Article 3, Figure 7**). D'autre part, la déplétion en cholestérol par la M β CD entraîne une réduction non seulement de l'association de CD81 aux microdomaines à tétraspanines, mais aussi du nombre de cellules infectées par *P. yoelii* (et aussi par *P. falciparum* dans un modèle d'infection d'hépatocytes primaires humains) (**Article 3, Figures 9 et 10**). Ces résultats montrent que **le cholestérol membranaire contribue à la localisation de CD81 dans les microdomaines enrichis en tétraspanines et à l'infection par les sporozoïtes de *Plasmodium*.**

Nos résultats montrent que la palmitoylation de CD81 n'est pas nécessaire pour sa fonction au cours de l'infection par *P. yoelii*, puisque la suppression des sites de palmitoylation dans CD81 humain ne modifie pas sa capacité à permettre l'infection par *P. yoelii* de cellules Hepa1-6 dans lesquelles CD81 endogène (murin) a été bloqué par anticorps ou réprimé par siRNA (**Article 3, Figure 8**, et données non publiées).

Il est important de noter que la déplétion en cholestérol inhibe l'infection des cellules HepG2/CD81 par les sporozoïtes de *P. yoelii*, qui se fait de manière CD81-dépendante, mais n'a aucun effet sur l'infection des HepG2 et des HepG2/CD81 par les sporozoïtes de *P. berghei*, qui se fait de manière CD81-indépendante (**Article 3, Figure 11**). En revanche, la M β CD inhibe l'infection des cellules Hepa1-6, qui dépend de CD81, et dans une moindre mesure celle des hépatocytes de souris, où CD81 joue un rôle, par les sporozoïtes de *P. berghei* (**Figure 19**). Ces résultats démontrent un lien fonctionnel entre CD81 et le cholestérol membranaire au cours de l'infection par *Plasmodium*, et suggèrent que la localisation au sein des microdomaines est importante pour la fonction de CD81 au cours de l'infection par les sporozoïtes de *Plasmodium*.

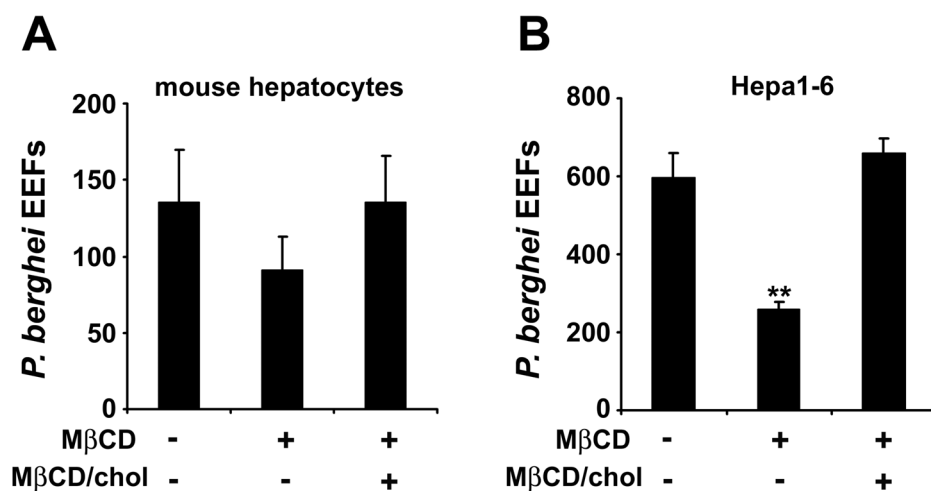


Figure 19. Nombre de schizontes hépatiques (exoerythrocytic forms, EEFs) 48 heures après inoculation de sporozoïtes de *P. berghei* dans des cultures d'hépatocytes primaires de souris (A) ou de cellules Hepa1-6 (B) préalablement traitées ou non par méthyl beta cyclodextrine (M β CD) ou par des complexes M β CD/cholestérol. **, $p < 0.01$.

**Rôle des partenaires moléculaires de CD81 au cours de l'infection
par les sporozoïtes de *Plasmodium*.**

Article 4 :

**The CD81 molecular partner EWI-F exerts a negative effect on host cell
infection by *Plasmodium yoelii* sporozoites.**

Olivier Silvie, Toufik Abache, Martine Billard, Jean-François Franetich, Laurent Hannoun,
Geert-Jan van Gemert, Adrian Luty, Claude Boucheix, Dominique Mazier, Eric Rubinstein.

Manuscrit en préparation.

Afin de caractériser les domaines de CD81 impliqués au cours de l'invasion des sporozoïtes, nous avons réalisé une étude de type structure-fonction à l'aide de molécules chimériques. Des expériences de complémentation ont tout d'abord montré que l'expression exogène de CD81 humain (par transfection d'un vecteur plasmidique) permet de restaurer l'infection des cellules Hepa1-6 par *P. yoelii* après siRNA ciblant CD81 murin endogène (**Article 4, Figure 1**). L'utilisation de différents chimères CD9/CD81 nous a permis de démontrer que **le domaine EC2 de CD81 est nécessaire et suffisant dans un contexte CD9 pour permettre l'infection par les sporozoïtes de *P. yoelii*** (**Article 4, Figure 1**). Comme nous l'avons vu précédemment, des formes solubles de ce domaine (protéines de fusion à la GST) n'interagissent pas directement avec les sporozoïtes. Dans la mesure où le domaine EC2 est impliqué dans les interactions avec les partenaires des tétraspanines (Matsumoto *et al.*, 1993; Yauch *et al.*, 2000; Berditchevski *et al.*, 2001; Charrin *et al.*, 2001; Kazarov *et al.*, 2002; Charrin *et al.*, 2003c), ces résultats orientent vers un possible rôle de molécules associées à CD81.

Pour caractériser les molécules associées à CD81 dans les cellules hépatocytaires, nous avons analysé différents types cellulaires permissifs au développement de *Plasmodium* : hépatocytes primaires humains, hépatocytes primaires de souris, cellules Hepa1-6 et cellules HepG2/CD81, par immunoprécipitation après marquage de la surface des cellules par la biotine (**Article 4, Figure 2**). Après lyse des cellules par la digitonine, qui permet l'étude des complexes primaires, nous avons pu observer que **les protéines majoritaires associées à CD81 dans les différents types cellulaires étudiés correspondent à EWI-F (aussi appelée CD9P-1 ou FPRP) et EWI-2 (aussi appelée PGRL), deux protéines de la superfamille des immunoglobulines déjà identifiées comme partenaires de CD81** (Charrin *et al.*, 2001; Clark *et al.*, 2001; Stipp *et al.*, 2001b; Stipp *et al.*, 2001a; Charrin *et al.*, 2003c) mais dont la fonction est actuellement inconnue.

Nous avons testé le rôle de EWI-F et EWI-2 au cours de l'infection par les sporozoïtes de *Plasmodium* en utilisant plusieurs approches. Les anticorps monoclonaux dirigés contre EWI-F humain (anticorps 1F11, (Charrin *et al.*, 2001)) et EWI-2 humain (anticorps 8A12,

(Charrin *et al.*, 2003c)) ne bloquent pas l'infection des hépatocytes humains par les sporozoïtes de *P. falciparum*, ni celle des HepG2/CD81 par les sporozoïtes de *P. yoelii* (**Article 4, Figure 6**). De plus, l'anticorps anti-EWI-F de souris 8G1 ne bloque pas l'infection des Hepa1-6 par les sporozoïtes de *P. yoelii*. D'autre part, des protéines solubles correspondant aux domaines extracellulaires de EWI-F et EWI-2 humains fusionnés au domaine Fc des immunoglobulines ne se fixent pas sur les sporozoïtes de *P. falciparum*, et n'inhibent pas l'infection des HepG2/CD81 par les sporozoïtes de *P. yoelii* (**Article 4, Figure 5**). Ces résultats suggèrent qu'il n'y a pas d'interaction directe entre EWI-F ou EWI-2 et les sporozoïtes.

Nous avons aussi utilisé l'ARN interférence pour inhiber l'expression de EWI-F et EWI-2 dans les cellules Hepa1-6 et les cellules HepG2/CD81. Alors que l'inhibition d'expression de EWI-2 n'a aucune conséquence sur l'infection des cellules Hepa1-6 et HepG2/CD81 par *P. yoelii*, celle de EWI-F entraîne une facilitation de l'infection dans les deux types cellulaires (**Article 4, Figure 3**). Au contraire, la surexpression de EWI-F (par transfection d'un vecteur plasmidique) inhibe l'infection des cellules Hepa1-6 (**Article 4, Figure 4**). Ces résultats démontrent que EWI-F et EWI-2 ne jouent pas un rôle de récepteur pour *Plasmodium*, mais indiquent que **EWI-F module négativement l'infection par les sporozoïtes**.

DISCUSSION

I. Implication de CD81 au cours de l'infection par les sporozoïtes de *Plasmodium*

L'infection des hépatocytes par les sporozoïtes constitue une première étape obligatoire du cycle de *Plasmodium* chez l'hôte vertébré. Selon le modèle actuellement admis, les sporozoïtes pénètrent dans les hépatocytes de manière active, en formant un compartiment membranaire particulier, la vacuole parasitophore. La formation de la vacuole se fait au moment de l'invasion, et résulte de la redistribution antéro-postérieure de ligands parasitaires fixés à des récepteurs hépatocytaires. La nature de ces interactions moléculaires reste inconnue. Nous avons maintenant démontré que la tétraspanine CD81 exprimée à la surface des cellules hôtes joue un rôle majeur au cours de l'infection par les sporozoïtes de plusieurs espèces plasmodiales. CD81 est la première molécule de l'hôte identifiée comme essentielle à l'infection par les sporozoïtes.

I.1. Le rôle de CD81 dépend de l'espèce plasmodiale et du type de cellules hôtes

L'ensemble de nos résultats montre que l'implication de CD81 au cours de l'infection par les sporozoïtes dépend d'une part de l'espèce plasmodiale et d'autre part de la nature des cellules hôtes. En utilisant différentes approches (souris knockout, anticorps, siRNA, transfection), nous avons démontré que l'infection par les sporozoïtes de *P. yoelii* dépend de CD81, dans tous les modèles testés. Nous avons également découvert que les sporozoïtes de *P. yoelii* infectent aussi bien les hépatocytes humains que les hépatocytes de souris *in vitro*, et que CD81 humain peut remplacer fonctionnellement CD81 murin dans les hépatocytes de souris transgéniques ou dans les cellules Hepa1-6. De plus, l'expression de CD81 humain suffit à rendre les cellules HepG2 susceptibles à l'infection par les sporozoïtes de *P. yoelii*.

CD81 est également nécessaire lors de l'infection par les sporozoïtes de *P. falciparum*, comme en témoigne l'inhibition induite par anticorps anti-CD81 ou par siRNA ciblant CD81 dans les hépatocytes humains. A la différence de *P. yoelii*, les sporozoïtes de *P. falciparum* infectent les hépatocytes humains mais pas les hépatocytes de souris. Cette barrière d'espèce ne repose pas sur CD81 (ou pas uniquement) car l'expression de CD81 humain ne rend pas les hépatocytes des souris transgéniques sensibles à l'infection par les sporozoïtes de

P. falciparum. Par ailleurs, contrairement à *P. yoelii*, l'expression de CD81 humain ne suffit pas à rendre les cellules HepG2 sensibles à l'infection par les sporozoïtes de *P. falciparum*. L'infection par *P. falciparum* nécessite donc d'autres facteurs de l'hôte, exprimés dans les hépatocytes primaires humains mais pas dans les HepG2.

L'infection par les sporozoïtes de *P. berghei* est plus complexe car plusieurs voies semblent impliquées. Il était connu depuis longtemps que les sporozoïtes de *P. berghei* infectent facilement les cellules HepG2 (Hollingdale *et al.*, 1983). L'expression de CD81 dans les HepG2 ne modifie pas le niveau d'infection par *P. berghei*, et les anticorps anti-CD81 ainsi que les siRNA ciblant CD81 n'ont aucun effet sur l'infection des cellules HepG2/CD81 par les sporozoïtes de *P. berghei*. De plus, *P. berghei* est également capable d'infecter d'autres cellules de lignées humaines hépatocytaires, comme les cellules HuH7, et des lignées non hépatocytaires, comme les cellules HeLa (Carrolo *et al.*, 2003). Comme pour les HepG2/CD81, l'infection des cellules HuH7 et des HeLa par *P. berghei* n'est pas bloquée par des anticorps anti-CD81 (O. Silvie, données non publiées). A la différence de *P. yoelii*, les sporozoïtes de *P. berghei* infectent les hépatocytes des souris déficientes en CD81, aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*. Cependant, de manière reproductible, nous avons observé que le nombre de cellules infectées *in vitro* est toujours inférieur d'environ 50% dans les hépatocytes cd81-/- par rapport aux hépatocytes de phénotype sauvage. De plus, l'infection des hépatocytes de souris par *P. berghei* est partiellement bloquée par l'anticorps anti-CD81 de souris MT81. Ces résultats montrent que *P. berghei* utilise deux voies distinctes pour infecter les hépatocytes de souris, une voie CD81-dépendante et une voie CD81-indépendante. De façon remarquable, les sporozoïtes de *P. berghei* infectent les cellules Hepa1-6 uniquement par une voie CD81-dépendante. En effet, l'infection peut être totalement bloquée par l'anticorps anti-CD81 MT81 *in vitro*. Par ailleurs, l'inhibition par siRNA de l'expression de CD81 à la surface des cellules entraîne également une inhibition de l'infection par les sporozoïtes de *P. berghei*. Notons toutefois que cette inhibition est moins marquée qu'avec *P. yoelii*, ce qui suggère que l'infection des cellules Hepa1-6 par les sporozoïtes de *P. berghei* pourrait nécessiter un seuil d'expression de CD81 plus faible que *P. yoelii*. Les différents résultats obtenus avec les trois espèces plasmodiales étudiées sont résumés dans le **Tableau 3**.

	Cellules humaines			Cellules de souris	
	Hépatocytes humains	HepG2	HepG2/CD81	Hépatocytes de souris	Hepa1-6
<i>P. falciparum</i>	Infection CD81-dépendante	Pas d'infection	Pas d'infection	Pas d'infection	Pas d'infection
<i>P. yoelii</i>	Infection (Rôle de CD81 non testé)	Pas d'infection	Infection CD81-dépendante	Infection CD81-dépendante	Infection CD81-dépendante
<i>P. berghei</i>	Infection (Rôle de CD81 non testé)	Infection CD81-indépendante	Infection CD81-indépendante	Infection CD81-dépendante et CD81-indépendante	Infection CD81-dépendante

Tableau 3. Susceptibilité des différents types cellulaires vis-à-vis des espèces plasmodiales testées.

Deux points méritent d'être soulignés. Tout d'abord, nos résultats montrent que mise à part une dépendance différentielle vis à vis de CD81, l'infection par les sporozoïtes de *P. yoelii* et celle par *P. berghei* présentent des caractéristiques communes qui les distinguent de l'infection par *P. falciparum*, d'une part par l'absence de barrière d'espèce lors de l'infection des hépatocytes, d'autre part par leur capacité à infecter des cellules de lignées. On peut noter que dans les HepG2/CD81 le niveau d'infection obtenu avec *P. yoelii* est assez proche de celui obtenu avec *P. berghei*. Par ailleurs, le niveau d'infection est plus faible dans les cellules Hepa1-6, aussi bien avec *P. yoelii* que *P. berghei*, et dépend dans les deux cas de CD81. Le séquençage des génomes de *P. yoelii* (Carlton *et al.*, 2002) et *P. berghei* (Hall *et al.*, 2005) a révélé que ces deux parasites de rongeurs sont génétiquement proches. Leurs séquences protéiques sont globalement identiques à près de 90% (Hall *et al.*, 2005). Par contre, *P. yoelii* et *P. berghei* ne sont globalement identiques qu'à environ 60% à *P. falciparum*, en terme de séquence protéique (Hall *et al.*, 2005). Il est important de noter que les hôtes naturels de *P. berghei* et de *P. yoelii* sont des rats arboricoles (*Gramnomys* et *Thamnomys*, respectivement) (Landau and Killick-Kendrick, 1966). Il serait donc intéressant

d'évaluer le rôle de CD81 chez ces animaux au cours de l'infection par les sporozoïtes de *P. berghei* et *P. yoelii*. Il serait également intéressant de déterminer si CD81 participe à l'infection par d'autres *Plasmodium*, notamment *P. vivax*, dont les sporozoïtes sont capables d'infecter les cellules HepG2 (Hollingdale *et al.*, 1985).

Un deuxième point intéressant est la capacité des sporozoïtes de *P. berghei* à utiliser deux voies différentes, l'une dépendante de CD81 et l'autre indépendante de CD81, en fonction du type de cellules cibles. De manière similaire, les mérozoïtes de *P. falciparum* peuvent utiliser plusieurs voies pour infecter les globules rouges. Ces voies reposent sur l'utilisation de différents ligands exprimés à la surface des mérozoïtes (notamment EBA-175) et de différents récepteurs présents à la surface des érythrocytes (notamment les glycophorines A, B et C) (Gaur *et al.*, 2004). L'importance de chacune des voies dans l'invasion des globules rouges varie d'une souche parasitaire à l'autre (Gaur *et al.*, 2004). Le fait que les sporozoïtes de *P. berghei* puissent infecter leurs cellules cibles, et en particulier les hépatocytes de souris, en utilisant deux voies différentes, suggère la possibilité d'une redondance des voies d'invasion également dans le cas de l'infection par les sporozoïtes.

I.2. Etapes de l'infection mettant en jeu CD81

En l'absence de CD81, les sporozoïtes sont toujours capables de s'attacher aux cellules. En utilisant une technique de double marquage (Renia *et al.*, 1988; Silvie *et al.*, 2002), indispensable pour distinguer les sporozoïtes internalisés des sporozoïtes extracellulaires restés attachés aux cellules, nous avons démontré que l'absence ou le blocage de CD81 entraîne une réduction majeure du nombre de parasites intracellulaires. De plus, les anticorps anti-CD81 inhibent l'infection par les sporozoïtes seulement lorsqu'ils sont mis en présence des cellules avant ou en même temps que les sporozoïtes, et n'ont par contre aucun effet lorsqu'ils sont ajoutés aux cultures après la pénétration des sporozoïtes, ce qui confirme que CD81 est impliqué aux stades précoces de l'infection.

Les sporozoïtes peuvent pénétrer dans les cellules de deux manières différentes, soit par effraction membranaire, soit par formation d'une vacuole parasitophore. Le mode d'entrée par effraction membranaire est utilisé par les sporozoïtes pour migrer à travers plusieurs cellules. Cette transcytose précède l'invasion par formation d'une vacuole parasitophore, au sein de laquelle le parasite se différencie et se multiplie. Nos résultats obtenus en utilisant un

marqueur dextran fluorescent indiquent très clairement que CD81 n'est pas impliqué dans la migration à travers les cellules, puisque les sporozoïtes migrent aussi bien dans les cellules déficientes en CD81 (hépatocytes *cd81*^{-/-}, HepG2) que dans les cellules exprimant CD81 (hépatocytes normaux, HepG2/CD81), et les anticorps anti-CD81 ne réduisent pas le nombre de cellules traversées par les sporozoïtes. Jusqu'à présent, les seuls facteurs identifiés comme jouant un rôle au cours de la transcytose des sporozoïtes sont des protéines du parasite, notamment une phospholipase membranaire et une protéine possédant un domaine de type perforine (Ishino *et al.*, 2004; Bhanot *et al.*, 2005; Ishino *et al.*, 2005a). Ces protéines pourraient être impliquées dans la lyse de la membrane plasmique de la cellule par le sporozoïte en cours de migration. Il ne semble pas y avoir de spécificité cellulaire de l'activité de transcytose, car les sporozoïtes de plusieurs espèces plasmodiales sont capables de migrer à travers divers types cellulaires (Mota *et al.*, 2001b).

L'utilisation du test au dextran a par ailleurs révélé qu'en l'absence de CD81 (hépatocytes *cd81*^{-/-}, cellules HepG2), les sporozoïtes de *P. yoelii* et de *P. falciparum* retrouvés dans les cellules à des temps précoces (1 à 5 heures post-inoculation) sont des sporozoïtes en cours de migration. Ce résultat, combiné à la réduction majeure du nombre de parasites intracellulaires observés en l'absence de CD81, implique que CD81 est nécessaire pour l'invasion des sporozoïtes par formation d'une vacuole. L'invasion des sporozoïtes par formation de la vacuole parasitophore comprend théoriquement plusieurs étapes : interactions ligands-récepteurs formant la jonction, redistribution antéro-postérieure de la jonction, fusion membranaire aboutissant à la fermeture de la vacuole, modifications précoces de la vacuole. A l'heure actuelle, nos résultats ne permettent pas d'affirmer à laquelle de ces étapes CD81 intervient. Comme nous l'avons mentionné plus haut, nous n'avons pas noté de défaut d'attachement des sporozoïtes aux cellules en l'absence de CD81, mais l'attachement observé reflète probablement l'interaction entre la CSP qui recouvre la surface des sporozoïtes et les HSPG de la surface cellulaire, et masque l'attachement spécifique polarisé qui intervient lors de la formation de la jonction impliquée dans l'invasion.

Nos résultats ne permettent pas d'exclure que la vacuole puisse commencer à se former en l'absence de CD81, mais que le processus échoue pendant ou à la fin de l'internalisation du sporozoïte, qui serait alors rapidement éliminé de la cellule. Une limite du modèle *in vitro* est l'absence de synchronisation du processus d'invasion par formation de la vacuole, liée notamment à la migration des sporozoïtes avant l'infection. Même si le

processus d'invasion ne dure lui-même que quelques secondes, l'ensemble des événements de pénétration des sporozoïtes ont lieu entre 0 et 3 heures après inoculation des sporozoïtes *in vitro* (Mota *et al.*, 2001b; Silvie *et al.*, 2003b). Un autre obstacle majeur pour l'étude de la vacuole au moment de sa formation est l'absence de marqueurs spécifiques et précoces de la vacuole parasitophore des sporozoïtes de *Plasmodium*. En particulier, les protéines contenues dans les rhoptries des sporozoïtes n'ont pas été identifiées. Dans le cas de *Toxoplasma* par exemple, les protéines de rhoptries sont excrétées dans la vacuole au moment de l'internalisation des tachyzoïtes, ce qui permet de visualiser la vacuole en cours de formation (Hakansson *et al.*, 2001). Notons aussi qu'une protéine spécifiquement localisée à la jonction, RON-4, a récemment été caractérisée chez *Toxoplasma* (Alexander *et al.*, 2005; Lebrun *et al.*, 2005). Jusqu'à présent, de tels marqueurs n'ont pas été décrits chez les sporozoïtes de *Plasmodium*. La protéine UIS-4, récemment décrite comme présente chez les sporozoïtes et localisée au niveau de la membrane de la vacuole parasitophore entourant les schizontes (Kaiser *et al.*, 2004; Mueller *et al.*, 2005b), pourrait constituer un marqueur précoce de la vacuole, permettant notamment d'analyser l'invasion des sporozoïtes à des temps extrêmement précoces (quelques minutes post-invasion), notamment pour déterminer s'il peut y avoir formation transitoire d'une vacuole en l'absence de CD81.

Nous n'avons pas détecté CD81 au niveau de la vacuole parasitophore de *P. yoelii* et *P. falciparum* à des temps précoces (3 heures) ou plus tardifs (24-72 heures) post-infection (O. Silvie, données non publiées). On ne peut pas exclure que CD81 soit présent au niveau de la vacuole très précocement au moment de sa formation. Il est cependant important de rappeler qu'en théorie, selon le modèle d'invasion des zoïtes chez les *Apicomplexa*, les récepteurs cellulaires engagés dans des interactions avec leurs ligands parasites ne sont a priori pas internalisés, mais restent à la surface de la cellule au niveau de la jonction annulaire qui entoure le parasite en cours d'invasion (voir **Figure 5** dans l'introduction).

A 37°C, les sporozoïtes perdent rapidement leur capacité infectieuse (A. Siau, O. Silvie, *et al.*, observations personnelles), probablement parce qu'ils commencent à se différencier. Il a en effet été montré qu'en l'absence de cellules, les sporozoïtes de *P. berghei* peuvent se transformer en formes exo-érythrocytaires jeunes, par simple incubation à 37°C en présence de sérum (Kaiser *et al.*, 2003). Cela suggère que les sporozoïtes sont programmés pour se transformer en formes hépatiques. Nos résultats démontrent que la différenciation des sporozoïtes dans les cellules ne nécessite pas la formation d'une vacuole parasitophore au

moment de l'invasion. En effet, certains sporozoïtes en cours de transcytose se localisent dans le noyau de la cellule traversée, où ils peuvent initier leur différenciation en formes exo-érythrocytaires. CD81 n'est pas nécessaire à cette transformation, puisque les formes intranucléaires sont observées indépendamment de CD81, ce qui est compatible avec l'absence de rôle de CD81 au cours de l'activité de transcytose des sporozoïtes. Il est important de noter que ces formes intranucléaires ne représentent pas le processus normal d'infection. Elles ne sont observées que dans des cellules de lignées, qui prolifèrent en culture. Cela suggère que les sporozoïtes pourraient avoir accès au noyau des cellules en division, à l'occasion de la dissociation de l'enveloppe nucléaire pendant la mitose. *In vitro*, les hépatocytes primaires ne prolifèrent pas (ou très peu), ce qui expliquerait l'absence de formes intranucléaires observées dans ces cellules (à l'exception d'un schizonte de *P. yoelii* trouvé dans le noyau d'un hépatocyte de souris *cd81*^{-/-}).

I.3. Mécanismes impliqués : hypothèses

I.3.1. CD81 est-il un récepteur pour les sporozoïtes ?

Les résultats obtenus avec des molécules chimériques CD9/CD81 démontrent que la grande boucle extracellulaire de CD81 (domaine EC2), dans un contexte CD9, est nécessaire et suffisante à la fonction de CD81 au cours de l'infection par les sporozoïtes de *P. yoelii*. L'anticorps anti-CD81 humain 1D6, qui bloque l'interaction de CD81 avec la glycoprotéine E2 du VHC (Higginbottom *et al.*, 2000), inhibe également l'infection des hépatocytes humains par les sporozoïtes de *P. falciparum* et des HepG2/CD81 par ceux de *P. yoelii*. L'épitope de 1D6 est situé au niveau de l'hélice D du domaine EC2 de CD81, qui contient également des résidus essentiels pour la fixation de E2 (Higginbottom *et al.*, 2000). Des résultats récents obtenus au laboratoire montrent que le site de fixation de E2 sur CD81 n'est pas nécessaire pour l'infection par les sporozoïtes de *P. yoelii*. En effet, une construction chimérique CD81/9 dans laquelle la grande boucle extracellulaire est formée des hélices A, B et C de CD81 humain suivies des domaines D et E de CD9 (qui ne fixe pas E2), permet l'infection des cellules Hepa1-6 par *P. yoelii* après siRNA ciblant CD81 endogène murin (O. Silvie, données non publiées). Une analyse de type structure-fonction est actuellement en

cours pour identifier précisément les régions du domaine EC2 de CD81 impliquées dans l'infection par les sporozoïtes (S. Zougbedé, S. Yalaoui, P. Froissard, *et al.*, travaux en cours).

La démonstration que le domaine EC2 de CD81 porte la spécificité fonctionnelle de CD81 au cours de l'infection par les sporozoïtes justifie l'utilisation de formes recombinantes solubles de ce domaine, fusionné avec la GST, pour tenter de mettre en évidence une interaction avec le parasite. Des protéines recombinantes similaires ont déjà été utilisées pour bloquer l'infection par les VHCpp (Bartosch *et al.*, 2003a; Hsu *et al.*, 2003), la fusion des gamètes (Higginbottom *et al.*, 2003) ou encore la transmigration des lymphocytes (Barreiro *et al.*, 2004). En utilisant des protéines de fusion semblables à celles utilisées pour démontrer l'interaction E2-CD81, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'interaction directe entre les sporozoïtes de *Plasmodium* et le domaine EC2 de CD81. Si ces résultats ne sont pas en faveur d'un rôle direct de CD81 comme récepteur des sporozoïtes, nous ne pouvons pas exclure cette hypothèse. En particulier, on peut imaginer que le domaine EC2 de CD81 sous forme recombinante n'ait pas une affinité suffisante pour les sporozoïtes, ce qui expliquerait l'absence d'interaction détectable avec les protéines de fusion à la GST que nous avons utilisées. L'analyse par SELDI-TOF a montré que ces protéines étaient présentes au moins en partie sous forme de dimères, mais on ne peut exclure que des molécules de plus grande valence (tétramères ou plus) soient nécessaires pour mettre en évidence une éventuelle interaction avec le parasite.

Il est intéressant de noter que l'expression de CD81 murin ou humain obtenue par transfection de plasmide augmente l'efficacité d'infection dans les cellules Hepa1-6. Cela suggère que dans ces cellules, le niveau d'expression de CD81 est un facteur limitant. Ces cellules restent cependant beaucoup moins sensibles à l'infection que les cellules HepG2/CD81, même dans des conditions de transfection transitoire permettant l'expression de CD81 à un niveau comparable à celui des cellules HepG2/CD81 dans une large proportion des cellules (>50%). Ces observations suggèrent que CD81 n'est pas le seul facteur limitant dans les cellules Hepa1-6. Nos résultats démontrent aussi que l'expression de CD81 n'est pas suffisante pour permettre l'invasion productive par les sporozoïtes de *P. falciparum*, ce qui indique clairement que d'autres molécules sont impliquées dans le cas de *P. falciparum*.

I.3.2. Hypothèse d'une molécule associée à CD81

L'absence d'interaction directe détectable entre CD81 et les sporozoïtes et la capacité des tétraspanines à s'associer à de multiples protéines de surface au sein des microdomaines enrichis en tétraspanines, nous amènent à proposer que CD81 est impliqué indirectement, via l'association à une molécule partenaire qui jouerait un rôle essentiel au cours de l'infection par les sporozoïtes de *Plasmodium*. De manière similaire, les résultats d'expériences montrant qu'une forme recombinante du domaine EC2 de CD9 est capable de bloquer la fusion quand elle est incubée avec les ovocytes, mais pas avec les spermatozoïdes, suggèrent que CD9 n'interagit pas en *trans* avec un ligand des spermatozoïdes, mais intervient au cours de la fusion des gamètes en modulant en *cis* l'activité d'une molécule partenaire sur l'ovocyte (Zhu *et al.*, 2002). D'autres études ont par ailleurs montré que le domaine EC2 participe non seulement à la fonction des tétraspanines mais aussi aux interactions avec les molécules partenaires (Matsumoto *et al.*, 1993; Yauch *et al.*, 2000; Berdichevski *et al.*, 2001; Charrin *et al.*, 2001; Hasuwa *et al.*, 2001; Kazarov *et al.*, 2002; Charrin *et al.*, 2003c). La démonstration que le domaine EC2 de CD81 est nécessaire pour l'infection par les sporozoïtes est donc parfaitement compatible avec le rôle d'une molécule associée à CD81. Nous avons vu dans l'introduction comment l'association aux tétraspanines peut moduler les fonctions de leurs partenaires. De manière similaire, l'association à CD81 pourrait être nécessaire à l'expression à la surface des cellules d'un partenaire essentiel pour l'infection par les sporozoïtes, ou encore potentialiser sa capacité d'interagir avec un ligand parasitaire, dans l'hypothèse où ce partenaire jouerait un rôle de récepteur pour les sporozoïtes.

Si un partenaire de CD81 est essentiel à l'infection par *Plasmodium*, sa nature reste à déterminer. L'analyse par immunoprécipitation des molécules associées à CD81 a confirmé que les protéines majoritaires associées à CD81 dans les cellules hépatocytaires correspondent à EWI-F (aussi appelée CD9P1, pour CD9-partner 1, ou FPRP, pour prostaglandin F2 α receptor-regulatory protein) et EWI-2 (aussi appelée PGRL, pour prostaglandin regulatory-like protein), deux protéines déjà identifiées comme partenaires de CD81 et de CD9 dans les hépatocytes (Charrin *et al.*, 2003c). Nos résultats indiquent que ces deux partenaires de CD81 ne jouent pas un rôle de récepteur pour *Plasmodium*, et ne sont pas directement impliqués au cours de l'infection par les sporozoïtes. Par contre, EWI-F module négativement l'infection par les sporozoïtes. Ce rôle négatif ne semble pas lié à une interaction directe entre EWI-F et

le parasite, car des anticorps anti-EWI-F et une forme recombinante soluble de EWI-F n'ont aucune action sur l'infection par les sporozoïtes de *P. yoelii*. Des études sont en cours pour déterminer les mécanismes impliqués. Il est possible que la surexpression de EWI-F entraîne une relocalisation de CD81 vers un site non permissif pour l'infection. A cet égard, il a été montré que la surexpression de EWI-2 provoque une réorganisation des complexes à tétraspanines à la surface des cellules, avec redistribution de CD81 dans des filopodes (Stipp *et al.*, 2003a) et modification de la reconnaissance de CD81 par certains anticorps (Kolesnikova *et al.*, 2004). Des résultats préliminaires indiquent que la surexpression de EWI-F induit une diminution du ratio MT81_w/MT81 dans les cellules Hepa1-6, ce qui suggère une désorganisation des microdomaines enrichis en tétraspanines. Une autre possibilité est que EWI-F entre en compétition pour l'association à CD81 avec un autre partenaire de CD81, qui jouerait un rôle essentiel au cours de l'infection par les sporozoïtes.

Les expériences d'immunoprécipitation après marquage des cellules par la biotine ont montré que EWI-F et EWI-2 sont les partenaires majeurs de CD81 dans les cellules hépatocytaires, mais ne sont pas les seules molécules coprécipitées. En effet, après lyse en digitonine, deux autres bandes sont clairement visibles après immunoprécipitation de CD81 dans les hépatocytes humains, à ~50 kDa et ~35 kDa. Ces deux bandes pourraient correspondre respectivement à un fragment de clivage de EWI-2 (Stipp *et al.*, 2001b; Charrin *et al.*, 2003c) et à une forme dimérisée de CD81 (Kovalenko *et al.*, 2004). D'autres molécules sont vraisemblablement associées à CD81, et ne sont pas forcément détectables par des approches biochimiques de type immunoprécipitation, notamment en raison d'une possible dissociation des interactions par les détergents ou d'une possible compétition avec les anticorps anti-CD81 utilisés. A cet égard, les anticorps anti-CD81 ne sont pas capables de coprécipiter CD19 après lyse en digitonine, bien que CD19 soit un partenaire de CD81 (Bradbury *et al.*, 1992; Horvath *et al.*, 1998).

La sensibilité différentielle des cellules Hepa1-6 et HepG2/CD81 à l'infection par *P. yoelii* suggère que les molécules nécessaires à l'infection sont plus abondantes à la surface des cellules HepG2/CD81 qu'à la surface des Hepa1-6. Par ailleurs, le fait que la surexpression de CD81 dans les cellules HeLa (lignée d'adénocarcinome du col de l'utérus) facilite l'infection par les sporozoïtes de *P. yoelii* (O. Silvie, données non publiées) suggère que les molécules nécessaires à l'infection par les sporozoïtes de *P. yoelii* ne sont pas spécifiquement hépatocytaires. Par contre, l'infection par *P. falciparum* n'est observée que

dans les hépatocytes primaires humains, et pourrait donc nécessiter des facteurs spécifiquement hépatocytaires. Nous avons observé que l'anticorps anti-CD81 humain TS81 ne bloque que partiellement l'infection des hépatocytes humains par *P. falciparum* (inhibition maximale d'environ 50%), alors qu'un autre anti-CD81 humain, 1D6, est lui capable d'inhiber très efficacement l'infection par *P. falciparum* (>90% d'inhibition). De la même façon, TS81 inhibe partiellement l'infection des hépatocytes de souris transgéniques pour CD81 humain par les sporozoïtes de *P. yoelii* (inhibition maximale d'environ 50%). Par contre, TS81 est capable de bloquer complètement l'infection des HepG2/CD81 par *P. yoelii*. Ces observations suggèrent que dans les hépatocytes primaires une fraction des molécules CD81 compétentes pour l'infection par les sporozoïtes n'est pas reconnue par l'anticorps TS81, peut-être du fait d'une compétition de l'anticorps avec une molécule associée à CD81. Il est intéressant de noter que l'organisation des microdomaines enrichis en tétraspanines semble particulière au niveau du foie, comme le suggère le niveau de marquage par MT81w, plus élevé dans les cellules d'origine hépatocytaire que dans d'autres types cellulaires. Rappelons par ailleurs que la spécificité des interactions entre la CSP à la surface du sporozoïte et les HSPG hépatiques est sans doute en grande partie responsable de la spécificité tissulaire de l'infection par les sporozoïtes *in vivo*.

I.3.3. Autres mécanismes possibles

Comme nous l'avons détaillé dans l'introduction, les tétraspanines sont impliquées dans divers processus de remaniement membranaire, notamment dans des phénomènes de fusion membranaire. De manière similaire, CD81 pourrait jouer un rôle dans la fusion membranaire impliquée lors de la séparation de la vacuole parasitophore de la membrane plasmique de la cellule. Cependant, il est important de noter que CD9 n'est pas nécessaire à l'invasion par les sporozoïtes, puisque les souris *cd9*^{-/-} sont infectées par les sporozoïtes de *P. yoelii*, et ni les anticorps anti-CD9, ni les oligonucléotides siRNA ciblant CD9 n'inhibent l'infection par les sporozoïtes de *P. yoelii* et *P. falciparum* *in vitro*. CD9 a pourtant été impliqué dans les différents processus de remaniement membranaire mettant en jeu CD81, où CD9 joue d'ailleurs un rôle potentiellement majeur, comme dans la fusion des gamètes (Rubinstein *et al.*, In press). Par ailleurs, les sporozoïtes de *P. berghei* ([Article 1](#)) et les tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* sont capables d'infecter les hépatocytes de souris *cd81*^{-/-} *in*

vitro en formant une vacuole parasitophore, ce qui montre que CD81 n'est pas impliqué dans un mécanisme général de formation des vacuoles parasitaires des *Apicomplexa* (Silvie *et al.*, 2003a).

CD81 pourrait aussi être impliqué dans des signaux d'activation de la cellule hôte nécessaires pour l'infection par les sporozoïtes. Bien que CD81 comme d'autres tétraspanines ne possède pas de motifs caractéristiques de transduction de signal, certaines molécules impliquées dans des voies de signalisation peuvent s'associer aux tétraspanines. A titre d'exemple, une association de CD9 et CD81 avec un récepteur couplé à des protéines G a été décrite (Little *et al.*, 2004). Des composants de voies de signalisation intracellulaires peuvent également s'associer aux tétraspanines, comme la phosphatidylinositol 4-kinase (PI4K) (Berditchevski *et al.*, 1997; Yauch *et al.*, 1998) ou certaines isoenzymes de la protéine kinase C (PKC) (Zhang *et al.*, 2001). Certaines isoformes de la protéine 14-3-3 ont par ailleurs été décrites comme pouvant s'associer à CD81 dans certaines conditions (Clark *et al.*, 2004). Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, les tétraspanines sont capables de moduler des phénomènes de signalisation en aval de leurs partenaires. De manière similaire, CD81 pourrait participer à des événements de signalisation impliqués à des étapes très précoces de l'infection par les sporozoïtes, et nécessaires notamment pour la formation de la jonction entre le parasite et la cellule, ou encore lors de la formation de la vacuole parasitophore.

Carrolo *et coll.* ont montré que la migration des sporozoïtes à travers les cellules entraîne la sécrétion de l'hépatocyte growth factor (HGF), qui, en se fixant sur son récepteur c-Met sur les hépatocytes avoisinants, favoriserait le développement ultérieur des schizontes hépatiques (Carrolo *et al.*, 2003). Une étude récente sur des cellules épithéliales de glandes salivaires a mis en évidence que c-Met est présent dans des complexes incluant la tétraspanine CD151 et les intégrines $\alpha 3\beta 1$ et $\alpha 6\beta 1$. L'inhibition par siRNA de l'expression de CD151 ou des intégrines $\alpha 3$ et $\alpha 6$ supprime la prolifération cellulaire et la migration induites par l'HGF, alors qu'au contraire la surexpression de CD151 augmente les effets biologiques dépendant de l'HGF (Klosek *et al.*, 2005). Nous n'avons pas observé d'association de c-Met avec CD81 dans les cellules HepG2/CD81 lysées en digitonine, et l'inhibition d'expression par siRNA de CD81 ne modifie pas le niveau d'expression de c-Met à la surface des hépatocytes humains (O. Silvie, données non publiées). Plusieurs éléments suggèrent que les rôles de CD81 et de c-Met au cours de l'infection par *Plasmodium* ne sont pas liés. Tout d'abord, le rôle de c-Met au

cours de l'infection par les sporozoïtes concerne le développement des schizontes hépatiques, et ne semble pas impliquer l'étape d'invasion par les sporozoïtes (Carrolo *et al.*, 2003). La plupart des résultats de Carrolo et coll. ont de plus été obtenus dans le modèle d'infection des cellules HepG2 par *P. berghei*, système dans lequel l'infection ne dépend pas de CD81. Enfin, des travaux plus récents de l'équipe de M. Mota ont en fait démontré que l'HGF entraîne une résistance des cellules HepG2 à l'apoptose, qui pourrait expliquer l'effet bénéfique observé sur le développement des schizontes *in vitro* (Leiriao *et al.*, 2005).

II. Microdomaines enrichis en tétraspanines

En s'associant entre elles, à différents partenaires et aux lipides de la membrane, les tétraspanines organisent des microdomaines membranaires (Hemler, 2003). Comme nous l'avons vu dans l'introduction, ces microdomaines enrichis en tétraspanines sont différents des radeaux lipidiques classiques (Claas *et al.*, 2001; Hemler, 2003).

II.1. Développement d'un nouvel outil pour l'étude des microdomaines enrichis en tétraspanines

En vue de développer de nouveaux outils pour l'étude des tétraspanines et de leurs partenaires, nous avons produit de nouveaux anticorps monoclonaux de rat contre des complexes à tétraspanines de souris. Parmi les clones obtenus, nous avons pu sélectionner deux nouveaux anticorps anti-CD81 de souris (MT81 et MT81_w). MT81 (pour Mouse Tetraspanin CD81) reconnaît CD81 dans toutes les conditions testées (y compris en western blot) alors que MT81_w (pour Mouse Tetraspanin CD81 "Web") ne reconnaît qu'une fraction des molécules CD81. Plusieurs études récentes ont montré que des anticorps reconnaissant des sous-populations particulières d'une tétraspanine constituent des outils utiles pour l'étude des interactions moléculaires des tétraspanines, notamment à la surface des cellules vivantes. Il existe ainsi deux exemples d'anticorps monoclonaux anti-tétraspanine dont la fixation est modulée par l'expression des partenaires moléculaires de la tétraspanine reconnue. L'anticorps anti-CD151 TS151r ne reconnaît CD151 que lorsqu'il n'est pas associé aux intégrines $\alpha 3\beta 1$ ou $\alpha 6\beta 1$ (Serru *et al.*, 1999; Kazarov *et al.*, 2002; Sterk *et al.*, 2002), alors que la fixation de l'anti-CD9 PAINS13 à CD9 dépend à la fois de l'expression de l'intégrine $\alpha 6$ et

de l'activation de l'intégrine $\beta 1$ (Gutierrez-Lopez *et al.*, 2003). L'anticorps MT81w que nous décrivons ici ne reconnaît que CD81 associé aux autres tétraspanines. En effet, MT81w ne reconnaît pas CD81 après lyse des cellules dans des détergents qui ne préservent pas les interactions entre tétraspanines (Triton X-100, digitonine), et la déplétion des complexes à tétraspanines par immunoprécipitation de CD9 entraîne la déplétion concomitante de la fraction de CD81 reconnue par MT81w. En attendant des études complémentaires nécessaires pour déterminer les bases moléculaires de la spécificité restreinte de MT81w, nous ne pouvons que proposer quelques hypothèses. MT81w pourrait être un anticorps de faible affinité se fixant à CD81 de manière bivalente. Dans ce cas, MT81w fixerait préférentiellement les molécules de CD81 regroupées au sein des microdomaines à tétraspanines. Une autre possibilité est que MT81w reconnaît un épitope sur CD81 dont l'expression dépend de la localisation de CD81 dans les microdomaines. Un tel épitope pourrait être induit par l'association de CD81 aux autres tétraspanines ou aux lipides associés aux tétraspanines dans les microdomaines. Quel que soit le mécanisme moléculaire responsable de la spécificité restreinte de MT81w, nos résultats montrent que cet anticorps constitue un marqueur de l'association de CD81 aux microdomaines enrichis en tétraspanines.

En comparant le niveau de fixation de MT81w sur différents types cellulaires murins, et plus précisément en analysant le ratio MT81w/MT81, qui reflète le niveau d'engagement de CD81 dans les microdomaines, nous avons découvert qu'une fraction majeure de CD81 est associée aux microdomaines à tétraspanines dans les cellules d'origine hépatocytaire, aussi bien les Hepa1-6 (ratio MT81w/MT81 = 0,4-0,6) que les hépatocytes primaires de souris (ratio MT81w/MT81 = 0,55-0,75). Au contraire, le ratio MT81w/MT81 est plus faible sur les fibroblastes embryonnaires (ratio $\sim 0,3$) et très faible sur les cellules fibroblastiques LM (ratio $\sim 0,03$). Ces résultats suggèrent qu'un haut niveau d'engagement de CD81 dans les microdomaines enrichis en tétraspanines pourrait constituer une propriété particulière des cellules d'origine épithéliale et/ou hépatocytaire.

II.2. Rôle du cholestérol dans l'organisation des microdomaines enrichis en tétraspanines

Bien qu'il s'associe directement aux tétraspanines (Charrin *et al.*, 2003b), le rôle du cholestérol dans les interactions entre tétraspanines est controversé. Plusieurs études ont montré que la déplétion en cholestérol par la méthyl beta cyclodextrine (M β CD), un

oligosaccharide cyclique qui extrait sélectivement le cholestérol des membranes, entraîne une réduction marquée de la fraction des tétraspanines récupérée dans les fractions légères des gradients de sucrose (Claas *et al.*, 2001; Delaguillaumie *et al.*, 2004; Schmidt *et al.*, 2004). Cependant, ce phénomène pourrait résulter d'un relargage (« shedding ») des complexes à tétraspanines de la membrane plasmique, induit par la M β CD, plutôt que d'une dissociation des interactions entre tétraspanines (Claas *et al.*, 2001). En particulier, le traitement des cellules intactes par la M β CD ne supprime pas les interactions entre tétraspanines, notamment CD9/CD81 (Claas *et al.*, 2001; Charrin *et al.*, 2003a; Charrin *et al.*, 2003b). Il faut cependant noter que les interactions entre tétraspanines peuvent être dissociées lorsque les cellules sont lysées en Brij 97 en présence de M β CD (Charrin *et al.*, 2003b). Dans ce cas, la présence de détergent pourrait faciliter l'accès de la M β CD au cholestérol associé aux tétraspanines. A cet égard, il a été montré que les interactions CD81/CD9 sont facilement dissociées par le traitement par la saponine, un autre agent capable de séquestrer le cholestérol (Charrin *et al.*, 2003b).

Charrin et coll. ont par ailleurs observé que la digitonine, un agent précipitant le cholestérol, est capable de précipiter les tétraspanines, préférentiellement quand elles sont associées entre elles (Charrin *et al.*, 2003b). Nos résultats montrent que la digitonine précipite préférentiellement la fraction de CD81 reconnue par l'anticorps MT81w, c'est-à-dire CD81 associé aux autres tétraspanines. Cela suggère que le cholestérol est associé de façon plus importante aux tétraspanines associées les unes aux autres, renforçant l'hypothèse selon laquelle l'association au cholestérol membranaire est concomitante à l'association des tétraspanines entre elles (Charrin *et al.*, 2003b).

Ici, en utilisant l'anticorps MT81w comme marqueur des interactions entre tétraspanines, nous démontrons sans biais biochimique que le cholestérol membranaire contribue à l'organisation des microdomaines enrichis en tétraspanines à la surface des cellules. En effet, la fixation de MT81w sur les cellules vivantes diminue de façon réversible après déplétion du cholestérol membranaire induite par M β CD, et au contraire augmente après ajout de cholestérol aux cellules.

L'observation que la M β CD désorganise les microdomaines enrichis en tétraspanines, comme le montre la diminution du marquage par MT81w, sans induire de modification majeure des interactions tétraspanine/tétraspanine détectables par des approches biochimiques d'immunoprécipitation (Claas *et al.*, 2001; Charrin *et al.*, 2003b), suggère l'existence de

différents niveaux d'organisation des microdomaines à tétraspanines (**Figure 20**). A un premier niveau, les tétraspanines interagiraient entre elles par un mécanisme qui n'est pas affecté par le traitement des cellules intactes par la M β CD. Ce niveau d'interaction fait cependant probablement intervenir le cholestérol membranaire, puisque les interactions tétraspanine/tétraspanine peuvent être dissociées par traitement des cellules par la saponine ou lorsque les cellules sont lysées en Brij 97 en présence de M β CD (Charrin *et al.*, 2003b). Le cholestérol impliqué à ce premier niveau, inaccessible à la M β CD, pourrait correspondre au cholestérol du feuillet interne de la membrane, peut-être protégé de l'action par la M β CD par les domaines transmembranaires et les palmitates des tétraspanines, et rendu accessible seulement en présence de détergent.

A un deuxième niveau, les complexes de niveau 1 pourraient se regrouper pour former des structures plus complexes, selon un mécanisme directement affecté par le traitement par la M β CD, et qui pourrait impliquer le cholestérol du feuillet externe de la membrane. L'existence d'un niveau d'interaction résistant à la M β CD expliquerait pourquoi les effets de la M β CD sur les cellules intactes ne sont pas détectables par les approches biochimiques, mais deviennent visibles grâce au marquage par l'anticorps MT81w. Ce deuxième niveau d'organisation des microdomaines enrichis en tétraspanines correspond probablement à un niveau fonctionnel, comme l'indiquent les effets induits par le traitement des cellules par la M β CD. Il a notamment été montré que les phosphorylations de tyrosines induites par stimulation par des anticorps anti-tétraspanines sont inhibées dans des cellules lymphoïdes B par le traitement par la M β CD, alors qu'au contraire elles sont augmentées par l'ajout de cholestérol aux cellules (Charrin *et al.*, 2003b). Dans une autre étude, tous les effets fonctionnels liés à l'engagement de CD82 étaient abolis ou très fortement réduits dans les cellules T Jurkat traitées par M β CD (Delaguillaumie *et al.*, 2004).

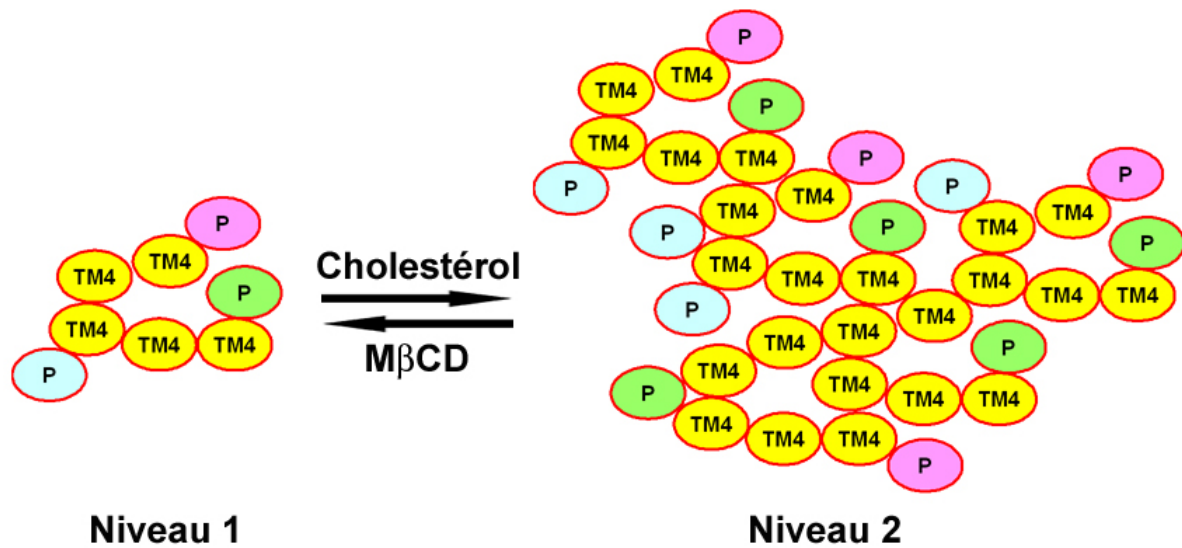


Figure 20. Différents niveaux possibles dans l'organisation des microdomaines enrichis en tétraspanines. La MβCD dissocie les interactions du niveau 2 mais pas celles du niveau 1 (qui pourtant implique probablement le cholestérol). La modulation du marquage MT81w par la MβCD correspondrait à une diminution des interactions de niveau 2. TM4 = tétraspanine, P = partenaire.

II.3. Rôle des microdomaines enrichis en tétraspanines au cours de l'infection par les sporozoïtes de *Plasmodium*

Nous démontrons ici que le cholestérol membranaire est nécessaire pour l'invasion par les sporozoïtes de *Plasmodium*, comme en témoigne l'inhibition réversible provoquée par la déplétion en cholestérol induite par la MβCD. Le cholestérol membranaire des cellules hôtes est également nécessaire lors de l'infection par les stades érythrocytaires de *Plasmodium* (Lauer *et al.*, 2000; Samuel *et al.*, 2001) et par les tachyzoïtes de *Toxoplasma gondii* (Coppens and Joiner, 2003). Dans ces deux cas, la membrane de la vacuole parasitophore est enrichie en composants des rafts (Mordue *et al.*, 1999; Lauer *et al.*, 2000), ce qui suggère que les tachyzoïtes de *Toxoplasma* et les mérozoïtes de *Plasmodium* pourraient utiliser les radeaux lipidiques classiques pour infecter leurs cellules cibles.

Plusieurs éléments suggèrent que l'effet de la MβCD sur l'infection par les sporozoïtes de *Plasmodium* est une conséquence de la désorganisation des microdomaines à tétraspanines. Premièrement, le degré d'inhibition de l'infection par *P. yoelii* dans les cellules Hepa1-6

traitées par la M β CD est du même ordre que la baisse du marquage par MT81w, qui reflète une désorganisation des microdomaines. De plus, l'ajout de cholestérol aux cellules augmente non seulement le marquage par MT81w mais aussi le niveau d'infection par les sporozoïtes, ce qui renforce la corrélation entre niveau d'infection et niveau d'engagement de CD81 dans les microdomaines. Deuxièmement, nos résultats démontrent clairement que CD81 engagé dans les microdomaines contribue à l'infection, puisque MT81w, qui ne reconnaît que CD81 associé aux autres tétraspanines, inhibe l'infection par les sporozoïtes de *P. yoelii* dans les cellules Hepa1-6. Troisièmement, il existe une très nette corrélation entre l'implication de CD81 et le rôle du cholestérol au cours de l'infection par les sporozoïtes de *Plasmodium*. En effet, la déplétion en cholestérol n'inhibe l'infection par les sporozoïtes que lorsque CD81 est nécessaire. La M β CD inhibe l'infection des hépatocytes de souris, des Hepa1-6 et des HepG2/CD81 par *P. yoelii*, l'infection des hépatocytes humains par *P. falciparum*, et l'infection des Hepa1-6 par *P. berghei*, toutes dépendantes de CD81. En revanche, le traitement par la M β CD n'a pas d'effet sur l'infection des cellules HepG2 (et HepG2/CD81) par les sporozoïtes de *P. berghei*, qui ne dépend pas de CD81.

Deux éléments peuvent sembler contradictoires avec l'hypothèse d'un rôle essentiel des microdomaines enrichis en tétraspanines dans l'infection par *Plasmodium*. Tout d'abord, alors que l'anticorps MT81, qui reconnaît toutes les molécules CD81, est capable d'inhiber presque totalement l'infection par les sporozoïtes, l'inhibition obtenue avec MT81w n'est pas totale, même à des concentrations saturantes de MT81w. Cependant, il est important de noter que MT81w ne reconnaît pas toutes les molécules de CD81 présentes dans les microdomaines. En effet, alors que le marquage par MT81w ne représente que 40 à 60% du niveau global d'expression de CD81 en surface (déterminé par le marquage par MT81), le degré d'association de CD81 aux microdomaines est supérieur, voisin de 85% dans les cellules Hepa1-6, comme le montre l'expérience de déplétion des complexes à tétraspanines par un anticorps anti-CD9. L'inhibition partielle de l'infection par MT81w pourrait donc n'être que le reflet d'une reconnaissance partielle des molécules de CD81 présentes dans les microdomaines, et ne permet donc pas d'exclure un rôle majeur voire exclusif de CD81 associé aux microdomaines enrichis en tétraspanines. A cet égard, on peut noter que l'ajout de cholestérol aux cellules Hepa1-6 augmente non seulement le niveau de marquage par MT81w mais aussi sa capacité à inhiber l'infection par *P. yoelii*. D'autre part, nos résultats démontrent que la palmitoylation de CD81 n'est pas nécessaire au cours de l'infection par *P. yoelii*,

puisque la suppression des sites de palmitoylation dans CD81 humain ne modifie pas sa capacité à permettre l'infection par *P. yoelii* de cellules Hepa1-6 dans lesquelles CD81 endogène (murin) a été bloqué par anticorps ou réprimé par siRNA. Plusieurs études ont pourtant montré que la palmitoylation contribue aux interactions entre tétraspanines (Berditchevski *et al.*, 2002; Charrin *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2004). Cependant, la palmitoylation n'est pas le seul facteur permettant les interactions entre tétraspanines. Le 2-bromopalmitate (2-BP), un analogue structural de l'acide palmitique ayant un effet inhibiteur sur la palmitoylation des protéines, ne modifie pas les interactions entre les tétraspanines CD9 et CD151 (Berditchevski *et al.*, 2002). De plus, un mutant dépalmitoylé de CD9 est toujours capable de s'associer aux autres tétraspanines dans certaines conditions de lyse (Brij97 supplémenté en ions divalents) (Charrin *et al.*, 2002). Il existe donc un ou plusieurs autres mécanismes d'interaction, indépendants de la palmitoylation. Rappelons par ailleurs que la palmitoylation des tétraspanines ne joue pas un rôle prépondérant dans la localisation des complexes à tétraspanines dans les fractions légères des gradients de sucrose (Berditchevski *et al.*, 2002; Charrin *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002), et qu'elle n'est pas non plus nécessaire pour l'association des tétraspanines à leurs partenaires, ni pour la formation de dimères de CD9 ou de CD81 (Berditchevski *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2002; Kovalenko *et al.*, 2004).

Par quels mécanismes les microdomaines enrichis en tétraspanines facilitent-ils l'infection par les sporozoïtes ?

La localisation de CD81 et de ses partenaires dans les microdomaines pourrait permettre de concentrer à la surface des cellules une molécule essentielle pour l'infection par *Plasmodium*. Nous avons vu dans l'introduction que l'association à CD9 augmente de façon considérable la capacité d'interaction du proHB-EGF avec la toxine diphtérique (Iwamoto *et al.*, 1994), ou encore que CD81 et CD151 augmentent la force d'interaction des intégrines avec leurs ligands (Feigelson *et al.*, 2003; Lammerding *et al.*, 2003; Nishiuchi *et al.*, 2005). De manière similaire, la concentration au sein des microdomaines d'un partenaire de CD81 pourrait permettre des interactions de forte avidité avec des ligands parasitaires, dans l'hypothèse où ce partenaire joue un rôle de récepteur pour les sporozoïtes. Des différences d'affinité pour leurs récepteurs entre les ligands de *P. berghei* et *P. yoelii* pourraient expliquer

les différences observées entre les deux parasites dans les cas où CD81 est impliqué. Notamment, dans le modèle d'infection des cellules Hepa1-6, une meilleure affinité des sporozoïtes de *P. berghei* pour des récepteurs cellulaires est peut-être à l'origine d'un seuil plus faible d'expression de CD81 nécessaire pour l'infection.

Selon un autre mécanisme, les microdomaines enrichis en tétraspanines pourraient permettre un couplage fonctionnel entre différentes molécules nécessaires lors de l'infection par les sporozoïtes, dont l'une au moins serait liée à CD81. A cet égard, la surexpression de EWI-2 inhibe la motilité liée à l'intégrine $\alpha 3 \beta 1$, partenaire de CD151 indirectement associée à EWI-2 via l'interaction de CD151 avec les tétraspanines CD81 et CD9, dont EWI-2 est un partenaire (Stipp *et al.*, 2003a). A part CD81, les seules molécules de l'hôte potentiellement impliquées lors de l'infection par les sporozoïtes de *Plasmodium* sont les héparanes sulfate protéoglycanes hépatiques (HSPG) (Baldacci and Menard, 2004; Frevert, 2004). Deux études ont rapporté une association entre les tétraspanines CD9 et CO-029 et certains protéoglycanes (certaines isoformes de CD44 et syndecan), dans les kératinocytes humains et dans une lignée d'adénocarcinome pancréatique de rat (Jones *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 2004). Comme nous l'avons vu dans l'introduction, le rôle des protéoglycanes du foie est probablement important dans l'attachement des sporozoïtes aux cellules, notamment dans des conditions dynamiques (Pinzon-Ortiz *et al.*, 2001). Par contre, les HSPG semblent contribuer seulement de façon mineure à la pénétration des sporozoïtes dans les cellules hôtes (Frevert *et al.*, 1996; Matuschewski *et al.*, 2002a). On peut cependant imaginer un couplage des HSPG, impliqués dans l'attachement des sporozoïtes, avec les éléments impliqués dans la formation de la jonction et dans la pénétration des sporozoïtes.

Enfin, les microdomaines enrichis en tétraspanines pourraient aussi jouer un rôle après la formation de la jonction entre le sporozoïte et la cellule. En particulier, l'environnement protéolipidique particulier des microdomaines pourrait faciliter les remaniements membranaires qui accompagnent la formation de la vacuole parasitophore. Une étude vient d'ailleurs de montrer que la fusion des pseudoparticules du VHC avec des liposomes, induite à pH acide, ne nécessite pas la présence de protéines à la surface des liposomes, mais est par contre facilitée en présence de cholestérol (Lavillette *et al.*, 2005a).

III. Conclusion et perspectives

Nous avons démontré que la tétraspanine CD81 joue un rôle essentiel et spécifique au cours de l'infection par les sporozoïtes de *Plasmodium*. L'absence d'interaction directe entre CD81 et les sporozoïtes, combinée à l'importance fonctionnelle de la localisation de CD81 au sein des microdomaines enrichis en tétraspanines, nous amènent à proposer que CD81 est impliqué indirectement, via l'association à une molécule partenaire qui jouerait un rôle crucial au cours de l'infection par les sporozoïtes de *Plasmodium*, et qui est distincte des partenaires déjà connus de CD81 dans les hépatocytes, EWI-F et EWI-2.

CD81 joue un rôle essentiel dans l'infection des hépatocytes par deux agents pathogènes majeurs, le parasite *Plasmodium* et le virus de l'hépatite C (VHC). Dans les deux cas, il semble que l'expression de CD81 ne soit pas suffisante et que d'autres protéines soient impliquées (Voisset and Dubuisson, 2004; Martin *et al.*, 2005). Il sera intéressant de déterminer si ces deux agents pathogènes partagent une dépendance vis-à-vis d'autres molécules que CD81. D'autres molécules impliquées dans l'infection par le VHC ont déjà été identifiées, notamment SR-B1 (Scarselli *et al.*, 2002; Bartosch *et al.*, 2003b; Lavillette *et al.*, 2005b), dont il sera pertinent d'analyser le rôle au cours de l'infection par les sporozoïtes de *Plasmodium*. L'expression de CD81 suffit à rendre les cellules HepG2 susceptibles à l'infection par le VHC mais pas par *P. falciparum*, ce qui indique que des facteurs additionnels sont spécifiquement requis pour l'infection par ce parasite.

L'identification des molécules associées à CD81 dans les cellules hépatocytaires présente donc un intérêt non seulement pour l'étude de *Plasmodium* mais aussi pour celle du VHC. Une approche par spectrométrie de masse visant à identifier de nouvelles molécules associées à CD81 dans les cellules d'origine hépatocytaire a été initiée au laboratoire (collaboration F. Le Naour et M. André, Inserm U602, Villejuif, et J. Chamot-Rooke, Ecole Polytechnique, Palaiseau).

Le cholestérol membranaire joue un rôle essentiel dans l'infection par de nombreux agents pathogènes intracellulaires, incluant divers virus, bactéries et protozoaires, dont certains utilisent les radeaux lipidiques pour infecter leurs cellules cibles (Simons and Ehehalt, 2002; Manes *et al.*, 2003). Nos résultats montrent que le cholestérol membranaire contribue également à l'infection par les sporozoïtes de *Plasmodium*, et que ce rôle est lié à la

localisation de CD81 dans les microdomaines enrichis en tétraspanines. En particulier, l'extraction du cholestérol membranaire par la M β CD induit une désorganisation des microdomaines enrichis en tétraspanines et inhibe l'invasion des cellules par les sporozoïtes. La M β CD inhibe également l'infection par les VHCpp (Zhang *et al.*, 2004), ce qui suggère que la localisation de CD81 dans les microdomaines enrichis en tétraspanines pourrait également jouer un rôle important au cours de l'infection par le VHC. De manière plus générale, la démonstration que la M β CD perturbe l'organisation des microdomaines enrichis en tétraspanines suggère que divers processus biologiques affectés par la M β CD pourraient aussi impliquer les microdomaines enrichis en tétraspanines.

Le principal vaccin anti-paludique actuellement développé chez l'homme, RTS,S, qui vise à induire des réponses contre la CSP, ne permet pas de protéger efficacement contre une infection par les sporozoïtes de *P. falciparum* (Alonso *et al.*, 2004; Alonso *et al.*, 2005). D'autres molécules parasitaires pourraient constituer de meilleurs candidats vaccinaux que la CSP, notamment les protéines des sporozoïtes impliquées dans la formation de la jonction avec l'hépatocyte. Les données du séquençage du génome de plusieurs espèces plasmodiales, combinées aux techniques de manipulations génétiques des parasites, devraient faciliter l'identification de nouvelles cibles parasitaires. A titre d'exemple, ce type d'approche a déjà permis de démontrer que les protéines P36 et P36p des sporozoïtes sont indispensables à l'invasion des hépatocytes (Ishino *et al.*, 2005b; van Dijk *et al.*, 2005), et constituent donc des cibles potentielles pour des approches anti-sporozoïtes, notamment vaccinales.

Selon une autre approche, la démonstration du rôle de CD81 dans l'infection par les sporozoïtes de *Plasmodium* pourrait permettre l'identification de récepteurs cellulaires, qui pourront eux-mêmes servir à identifier des ligands parasitaires jouant un rôle clef dans l'infection. Ces ligands constitueraient des cibles potentielles pour des vaccins visant à induire des réponses anticorps bloquant la pénétration des sporozoïtes, ou pour des molécules thérapeutiques capables d'interférer avec leur fonction. Par ailleurs, la démonstration que l'expression de CD81 dans les cellules HepG2 suffit à les rendre susceptibles à l'infection par les sporozoïtes de *P. yoelii* suggère que le développement d'une lignée cellulaire également susceptible à l'infection par les sporozoïtes de *P. falciparum* est possible. L'obtention d'une telle lignée constituera un progrès majeur pour l'évaluation des vaccins ciblant les sporozoïtes de *P. falciparum*, mais nécessitera l'identification des autres molécules de l'hôte spécifiquement impliquées dans l'infection par ce parasite. Une approche de criblage par

siRNA à haut débit est en cours de développement au laboratoire (Gego *et al.*, soumis), et pourrait permettre d'identifier non seulement des molécules de surface mais aussi d'autres facteurs de l'hôte essentiels pour l'invasion ou le développement des sporozoïtes.

L'étude de l'invasion par les mérozoïtes de *Plasmodium* et les tachyzoïtes de *Toxoplasma* a permis de dévoiler la complexité des mécanismes moléculaires mis en jeu (Tomley and Soldati, 2001; Dowse and Soldati, 2004). En particulier, il semble clair que l'invasion par ces parasites n'implique pas une mais plusieurs protéines parasitaires de surface, potentiellement associées au sein de complexes multimoléculaires (Tomley and Soldati, 2001; Dowse and Soldati, 2004). La redondance des voies utilisées pour l'invasion reflète d'ailleurs la diversité de ces molécules adhésives (Gaur *et al.*, 2004). De manière similaire, il est probable que de multiples molécules exposées à la surface des sporozoïtes de *Plasmodium* sont impliquées dans l'invasion des hépatocytes, et sont susceptibles d'interagir avec plusieurs récepteurs de la surface des hépatocytes, dont un au moins pourrait dépendre de CD81. La complexité de ces interactions moléculaires ainsi qu'une possible redondance des voies d'invasion risquent de représenter un obstacle majeur dans l'élaboration d'un vaccin destiné à bloquer efficacement l'infection par *Plasmodium* chez l'homme.

REFERENCES

Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G.B. and Zhang, Q.X. (1999) Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**: 12766-12771.

Aikawa, M., Miller, L.H., Johnson, J. and Rabbege, J. (1978) Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. *J Cell Biol*. **77**: 72-82.

Akaki, M. and Dvorak, J.A. (2005) A chemotactic response facilitates mosquito salivary gland infection by malaria sporozoites. *J Exp Biol*. **208**: 3211-3218.

Alexander, D.L., Mital, J., Ward, G.E., Bradley, P. and Boothroyd, J.C. (2005) Identification of the Moving Junction Complex of *Toxoplasma gondii*: A Collaboration between Distinct Secretory Organelles. *PLoS Pathog*. **1**: e17.

Allander, T., Forns, X., Emerson, S.U., Purcell, R.H. and Bukh, J. (2000) Hepatitis C virus envelope protein E2 binds to CD81 of tamarins. *Virology*. **277**: 358-367.

Allen, M.L., Dobrowolski, J.M., Muller, H., Sibley, L.D. and Mansour, T.E. (1997) Cloning and characterization of actin depolymerizing factor from *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol*. **88**: 43-52.

Al-Olayan, E.M., Beetsma, A.L., Butcher, G.A., Sinden, R.E. and Hurd, H. (2002) Complete development of mosquito phases of the malaria parasite in vitro. *Science*. **295**: 677-679.

Alonso, P.L., Sacarlal, J., Aponte, J.J., Leach, A., Macete, E., Aide, P., *et al* (2005) Duration of protection with RTS,S/AS02A malaria vaccine in prevention of *Plasmodium falciparum* disease in Mozambican children: single-blind extended follow-up of a randomised controlled trial. *Lancet*. **366**: 2012-2018.

Alonso, P.L., Sacarlal, J., Aponte, J.J., Leach, A., Macete, E., Milman, J., *et al* (2004) Efficacy of the RTS,S/AS02A vaccine against *Plasmodium falciparum* infection and disease in young African children: randomised controlled trial. *Lancet*. **364**: 1411-1420.

Aly, A.S. and Matuschewski, K. (2005) A malarial cysteine protease is necessary for *Plasmodium* sporozoite egress from oocysts. *J Exp Med*. **202**: 225-230.

Angelisova, P., Hilgert, I. and Horejsi, V. (1994) Association of four antigens of the tetraspans family (CD37, CD53, TAPA-1, and R2/C33) with MHC class II glycoproteins. *Immunogenetics*. **39**: 249-256.

Baldacci, P. and Menard, R. (2004) The elusive malaria sporozoite in the mammalian host. *Mol Microbiol*. **54**: 298-306.

Barreiro, O., Yanez-Mo, M., Sala-Valdes, M., Gutierrez-Lopez, M.D., Ovalle, S., Higginbottom, A., *et al* (2004) Endothelial tetraspanin microdomains regulate leukocyte firm adhesion during extravasation. *Blood*.

Bartosch, B., Dubuisson, J. and Cosset, F.L. (2003a) Infectious hepatitis C virus pseudo-particles containing functional E1-E2 envelope protein complexes. *J Exp Med*. **197**: 633-642.

Bartosch, B., Vitelli, A., Granier, C., Goujon, C., Dubuisson, J., Pascale, S., *et al* (2003b) Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor. *J Biol Chem.* **278**: 41624-41630.

Baum, J., Richard, D., Healer, J., Rug, M., Krnajski, Z., Gilberger, T.W., *et al* (2005) A conserved molecular motor drives cell invasion and gliding motility across malaria lifecycle stages and other apicomplexan parasites. *J Biol Chem.*

Beier, J.C., Onyango, F.K., Koros, J.K., Ramadhan, M., Ogwang, R., Wirtz, R.A., *et al* (1991) Quantitation of malaria sporozoites transmitted in vitro during salivation by wild Afrotropical Anopheles. *Med Vet Entomol.* **5**: 71-79.

Berditchevski, F. and Odintsova, E. (1999) Characterization of integrin-tetraspanin adhesion complexes: role of tetraspanins in integrin signaling. *J Cell Biol.* **146**: 477-492.

Berditchevski, F., Zutter, M.M. and Hemler, M.E. (1996) Characterization of novel complexes on the cell surface between integrins and proteins with 4 transmembrane domains (TM4 proteins). *Mol Biol Cell.* **7**: 193-207.

Berditchevski, F., Odintsova, E., Sawada, S. and Gilbert, E. (2002) Expression of the palmitoylation-deficient CD151 weakens the association of alpha 3 beta 1 integrin with the tetraspanin-enriched microdomains and affects integrin-dependent signaling. *J Biol Chem.* **277**: 36991-37000.

Berditchevski, F., Talias, K.F., Wong, K., Carpenter, C.L. and Hemler, M.E. (1997) A novel link between integrins, transmembrane-4 superfamily proteins (CD63 and CD81), and phosphatidylinositol 4-kinase. *J Biol Chem.* **272**: 2595-2598.

Berditchevski, F., Gilbert, E., Griffiths, M.R., Fitter, S., Ashman, L. and Jenner, S.J. (2001) Analysis of the CD151-alpha3beta1 integrin and CD151-tetraspanin interactions by mutagenesis. *J Biol Chem.* **276**: 41165-41174.

Bergman, L.W., Kaiser, K., Fujioka, H., Coppens, I., Daly, T.M., Fox, S., *et al* (2003) Myosin A tail domain interacting protein (MTIP) localizes to the inner membrane complex of Plasmodium sporozoites. *J Cell Sci.* **116**: 39-49.

Bhanot, P. and Nussenzweig, V. (2002) Plasmodium yoelii sporozoites infect Syndecan-1 deficient mice. *Mol Biochem Parasitol.* **123**: 143-144.

Bhanot, P., Schauer, K., Coppens, I. and Nussenzweig, V. (2005) A surface phospholipase is involved in the migration of plasmodium sporozoites through cells. *J Biol Chem.* **280**: 6752-6760.

Bienstock, R.J. and Barrett, J.C. (2001) KAI1, a prostate metastasis suppressor: prediction of solvated structure and interactions with binding partners; integrins, cadherins, and cell-surface receptor proteins. *Mol Carcinog.* **32**: 139-153.

Blackman, M.J. (2000) Proteases involved in erythrocyte invasion by the malaria parasite: function and potential as chemotherapeutic targets. *Curr Drug Targets.* **1**: 59-83.

Blackman, M.J. (2004) Proteases in host cell invasion by the malaria parasite. *Cell Microbiol.* **6**: 893-903.

Bojang, K.A., Milligan, P.J., Pinder, M., Vigneron, L., Alloueche, A., Kester, K.E., *et al* (2001) Efficacy of RTS,S/AS02 malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* infection in semi-immune adult men in The Gambia: a randomised trial. *Lancet.* **358**: 1927-1934.

Boucheix, C. and Rubinstein, E. (2001) Tetraspanins. *Cell Mol Life Sci.* **58**: 1189-1205.

Boucheix, C., Duc, G.H., Jasmin, C. and Rubinstein, E. (2001) Tetraspanins and malignancy. *Expert Rev Mol Med.* **2001**: 1-17.

Boucheix, C., Benoit, P., Frachet, P., Billard, M., Worthington, R.E., Gagnon, J. and Uzan, G. (1991) Molecular cloning of the CD9 antigen. A new family of cell surface proteins. *J Biol Chem.* **266**: 117-122.

Bouharoun-Tayoun, H., Attanath, P., Sabchareon, A., Chongsuphajaisiddhi, T. and Druilhe, P. (1990) Antibodies that protect humans against *Plasmodium falciparum* blood stages do not on their own inhibit parasite growth and invasion in vitro, but act in cooperation with monocytes. *J Exp Med.* **172**: 1633-1641.

Bradbury, L.E., Kansas, G.S., Levy, S., Evans, R.L. and Tedder, T.F. (1992) The CD19/CD21 signal transducing complex of human B lymphocytes includes the target of antiproliferative antibody-1 and Leu-13 molecules. *J Immunol.* **149**: 2841-2850.

Buscaglia, C.A., Coppens, I., Hol, W.G. and Nussenzweig, V. (2003) Sites of interaction between aldolase and thrombospondin-related anonymous protein in plasmodium. *Mol Biol Cell.* **14**: 4947-4957.

Cai, Z., Zhang, C., Chang, K.S., Jiang, J., Ahn, B.C., Wakita, T., *et al* (2005) Robust production of infectious hepatitis C virus (HCV) from stably HCV cDNA-transfected human hepatoma cells. *J Virol.* **79**: 13963-13973.

Cajot, J.F., Sordat, I., Silvestre, T. and Sordat, B. (1997) Differential display cloning identifies motility-related protein (MRP1/CD9) as highly expressed in primary compared to metastatic human colon carcinoma cells. *Cancer Res.* **57**: 2593-2597.

Calvo-Calle, J.M., Moreno, A., Eling, W.M. and Nardin, E.H. (1994) In vitro development of infectious liver stages of *P. yoelii* and *P. berghei* malaria in human cell lines. *Exp Parasitol.* **79**: 362-373.

Carlton, J.M., Angiuoli, S.V., Suh, B.B., Kooij, T.W., Perte, M., Silva, J.C., *et al* (2002) Genome sequence and comparative analysis of the model rodent malaria parasite *Plasmodium yoelii yoelii*. *Nature.* **419**: 512-519.

Carrolo, M., Giordano, S., Cabrita-Santos, L., Corso, S., Vigario, A.M., Silva, S., *et al* (2003) Hepatocyte growth factor and its receptor are required for malaria infection. *Nat Med.*

Carruthers, V.B. and Sibley, L.D. (1997) Sequential protein secretion from three distinct organelles of *Toxoplasma gondii* accompanies invasion of human fibroblasts. *Eur J Cell Biol.* **73**: 114-123.

Carruthers, V.B., Giddings, O.K. and Sibley, L.D. (1999) Secretion of micronemal proteins is associated with toxoplasma invasion of host cells. *Cell Microbiol.* **1**: 225-235.

Carter, R., Mendis, K.N., Miller, L.H., Molineaux, L. and Saul, A. (2000) Malaria transmission-blocking vaccines--how can their development be supported? *Nat Med.* **6**: 241-244.

Carvalho, T.G., Thiberge, S., Sakamoto, H. and Menard, R. (2004) Conditional mutagenesis using site-specific recombination in *Plasmodium berghei*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**: 14931-14936.

Cerami, C., Frevert, U., Sinnis, P., Takacs, B. and Nussenzweig, V. (1994) Rapid clearance of malaria circumsporozoite protein (CS) by hepatocytes. *J Exp Med.* **179**: 695-701.

Cerami, C., Frevert, U., Sinnis, P., Takacs, B., Clavijo, P., Santos, M.J. and Nussenzweig, V. (1992) The basolateral domain of the hepatocyte plasma membrane bears receptors for the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Cell.* **70**: 1021-1033.

Charrin, S., Manie, S., Oualid, M., Billard, M., Boucheix, C. and Rubinstein, E. (2002) Differential stability of tetraspanin/tetraspanin interactions: role of palmitoylation. *FEBS Lett.* **516**: 139-144.

Charrin, S., Manie, S., Billard, M., Ashman, L., Gerlier, D., Boucheix, C. and Rubinstein, E. (2003a) Multiple levels of interactions within the tetraspanin web. *Biochem Biophys Res Commun.* **304**: 107-112.

Charrin, S., Manie, S., Thiele, C., Billard, M., Gerlier, D., Boucheix, C. and Rubinstein, E. (2003b) A physical and functional link between cholesterol and tetraspanins. *Eur J Immunol.* **33**: 2479-2489.

Charrin, S., Le Naour, F., Oualid, M., Billard, M., Faure, G., Hanash, S.M., *et al* (2001) The major CD9 and CD81 molecular partner. Identification and characterization of the complexes. *J Biol Chem.* **276**: 14329-14337.

Charrin, S., Le Naour, F., Labas, V., Billard, M., Le Caer, J.P., Emile, J.F., *et al* (2003c) EWI-2 is a new component of the tetraspanin web in hepatocytes and lymphoid cells. *Biochem J.* **373**: 409-421.

Chen, M.S., Tung, K.S., Coonrod, S.A., Takahashi, Y., Bigler, D., Chang, A., *et al* (1999) Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin $\alpha 6 \beta 1$: implications for murine fertilization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **96**: 11830-11835.

Cherukuri, A., Carter, R.H., Brooks, S., Bornmann, W., Finn, R., Dowd, C.S. and Pierce, S.K. (2004a) B cell signaling is regulated by induced palmitoylation of CD81. *J Biol Chem.* **279**: 31973-31982.

- Cherukuri, A., Shoham, T., Sohn, H.W., Levy, S., Brooks, S., Carter, R. and Pierce, S.K. (2004b) The tetraspanin CD81 is necessary for partitioning of coligated CD19/CD21-B cell antigen receptor complexes into signaling-active lipid rafts. *J Immunol.* **172**: 370-380.
- Chobotar, B., Danforth, H.D. and Entzeroth, R. (1993) Ultrastructural observations of host-cell invasion by sporozoites of *Eimeria papillata* in vivo. *Parasitol Res.* **79**: 15-23.
- Claas, C., Stipp, C.S. and Hemler, M.E. (2001) Evaluation of prototype transmembrane 4 superfamily protein complexes and their relation to lipid rafts. *J Biol Chem.* **276**: 7974-7984.
- Claas, C., Seiter, S., Claas, A., Savelyeva, L., Schwab, M. and Zoller, M. (1998) Association between the rat homologue of CO-029, a metastasis-associated tetraspanin molecule and consumption coagulopathy. *J Cell Biol.* **141**: 267-280.
- Clark, K.L., Zeng, Z., Langford, A.L., Bowen, S.M. and Todd, S.C. (2001) PGRL is a major CD81-associated protein on lymphocytes and distinguishes a new family of cell surface proteins. *J Immunol.* **167**: 5115-5121.
- Clark, K.L., Oelke, A., Johnson, M.E., Eilert, K.D., Simpson, P.C. and Todd, S.C. (2004) CD81 associates with 14-3-3 in a redox-regulated palmitoylation-dependent manner. *J Biol Chem.* **279**: 19401-19406.
- Claudianos, C., Dessens, J.T., Trueman, H.E., Arai, M., Mendoza, J., Butcher, G.A., *et al* (2002) A malaria scavenger receptor-like protein essential for parasite development. *Mol Microbiol.* **45**: 1473-1484.
- Clay, D., Rubinstein, E., Mishal, Z., Anjo, A., Prenant, M., Jasmin, C., *et al* (2001) CD9 and megakaryocyte differentiation. *Blood.* **97**: 1982-1989.
- Clergeot, P.H., Gourgues, M., Cots, J., Laurans, F., Latorse, M.P., Pepin, R., *et al* (2001) PLS1, a gene encoding a tetraspanin-like protein, is required for penetration of rice leaf by the fungal pathogen *Magnaporthe grisea*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**: 6963-6968.
- Clyde, D.F., Most, H., McCarthy, V.C. and Vanderberg, J.P. (1973) Immunization of man against sporozite-induced falciparum malaria. *Am J Med Sci.* **266**: 169-177.
- Collins, W.E. and Contacos, P.G. (1972) Immunization of monkeys against *Plasmodium cynomolgi* by X-irradiated sporozoites. *Nat New Biol.* **236**: 176-177.
- Colombatti, A., Bonaldo, P. and Doliana, R. (1993) Type A modules: interacting domains found in several non-fibrillar collagens and in other extracellular matrix proteins. *Matrix.* **13**: 297-306.
- Connelly, M.A. and Williams, D.L. (2004) Scavenger receptor BI: a scavenger receptor with a mission to transport high density lipoprotein lipids. *Curr Opin Lipidol.* **15**: 287-295.
- Coppens, I. and Joiner, K.A. (2003) Host but not parasite cholesterol controls *Toxoplasma* cell entry by modulating organelle discharge. *Mol Biol Cell.* **14**: 3804-3820.

Coppi, A., Pinzon-Ortiz, C., Hutter, C. and Sinnis, P. (2005) The Plasmodium circumsporozoite protein is proteolytically processed during cell invasion. *J Exp Med.* **201**: 27-33.

Cormier, E.G., Tsamis, F., Kajumo, F., Durso, R.J., Gardner, J.P. and Dragic, T. (2004) CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**: 7270-7274.

Couchman, J.R. (2003) Syndecans: proteoglycan regulators of cell-surface microdomains? *Nat Rev Mol Cell Biol.* **4**: 926-937.

Crotta, S., Stilla, A., Wack, A., D'Andrea, A., Nuti, S., D'Oro, U., *et al* (2002) Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *J Exp Med.* **195**: 35-41.

Danforth, H.D., Aikawa, M., Cochrane, A.H. and Nussenzweig, R.S. (1980) Sporozoites of mammalian malaria: attachment to, interiorization and fate within macrophages. *J Protozool.* **27**: 193-202.

de Parseval, A., Lerner, D.L., Borrow, P., Willett, B.J. and Elder, J.H. (1997) Blocking of feline immunodeficiency virus infection by a monoclonal antibody to CD9 is via inhibition of virus release rather than interference with receptor binding. *J Virol.* **71**: 5742-5749.

Delaguillaumie, A., Lagaudriere-Gesbert, C., Popoff, M.R. and Conjeaud, H. (2002) Rho GTPases link cytoskeletal rearrangements and activation processes induced via the tetraspanin CD82 in T lymphocytes. *J Cell Sci.* **115**: 433-443.

Delaguillaumie, A., Harriague, J., Kohanna, S., Bismuth, G., Rubinstein, E., Seigneuret, M. and Conjeaud, H. (2004) Tetraspanin CD82 controls the association of cholesterol-dependent microdomains with the actin cytoskeleton in T lymphocytes: relevance to co-stimulation. *J Cell Sci.* **117**: 5269-5282.

Delorme, V., Cayla, X., Faure, G., Garcia, A. and Tardieux, I. (2003) Actin dynamics is controlled by a casein kinase II and phosphatase 2C interplay on Toxoplasma gondii Toxofilin. *Mol Biol Cell.* **14**: 1900-1912.

Deng, J., Yeung, V.P., Tsitoura, D., DeKruyff, R.H., Umetsu, D.T. and Levy, S. (2000) Allergen-induced airway hyperreactivity is diminished in CD81-deficient mice. *J Immunol.* **165**: 5054-5061.

Dessens, J.T., Beetsma, A.L., Dimopoulos, G., Wengelnik, K., Crisanti, A., Kafatos, F.C. and Sinden, R.E. (1999) CTRP is essential for mosquito infection by malaria ookinetes. *Embo J.* **18**: 6221-6227.

Dobrowolski, J.M. and Sibley, L.D. (1996) Toxoplasma invasion of mammalian cells is powered by the actin cytoskeleton of the parasite. *Cell.* **84**: 933-939.

Dobrowolski, J.M., Carruthers, V.B. and Sibley, L.D. (1997) Participation of myosin in gliding motility and host cell invasion by Toxoplasma gondii. *Mol Microbiol.* **26**: 163-173.

- Dong, J.T., Lamb, P.W., Rinker-Schaeffer, C.W., Vukanovic, J., Ichikawa, T., Isaacs, J.T. and Barrett, J.C. (1995) KAI1, a metastasis suppressor gene for prostate cancer on human chromosome 11p11.2. *Science*. **268**: 884-886.
- Dowse, T. and Soldati, D. (2004) Host cell invasion by the apicomplexans: the significance of microneme protein proteolysis. *Curr Opin Microbiol*. **7**: 388-396.
- Druilhe, P., Miltgen, F., Landau, I., Rinjard, J. and Gentilini, M. (1982) [Exo-erythrocytic schizogony of plasmodium falciparum in the monkey Cebus apella (author's transl)]. *C R Seances Acad Sci III*. **294**: 511-513.
- Druilhe, P., Spertini, F., Soesoe, D., Corradin, G., Mejia, P., Singh, S., *et al* (2005) A Malaria Vaccine That Elicits in Humans Antibodies Able to Kill Plasmodium falciparum. *PLoS Med*. **2**: e344.
- Dubremetz, J.F., Rodriguez, C. and Ferreira, E. (1985) Toxoplasma gondii: redistribution of monoclonal antibodies on tachyzoites during host cell invasion. *Exp Parasitol*. **59**: 24-32.
- Duffield, A., Kamsteeg, E.J., Brown, A.N., Pagel, P. and Caplan, M.J. (2003) The tetraspanin CD63 enhances the internalization of the H,K-ATPase beta-subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**: 15560-15565.
- Dugbartey, A.T., Dugbartey, M.T. and Apedo, M.Y. (1998) Delayed neuropsychiatric effects of malaria in Ghana. *J Nerv Ment Dis*. **186**: 183-186.
- Ellerman, D.A., Ha, C., Primakoff, P., Myles, D.G. and Dveksler, G.S. (2003) Direct binding of the ligand PSG17 to CD9 requires a CD9 site essential for sperm-egg fusion. *Mol Biol Cell*. **14**: 5098-5103.
- Entzeroth, R. (1985) Invasion and early development of Sarcocystis muris (Apicomplexa, Sarcocystidae) in tissue cultures. *J Protozool*. **32**: 446-453.
- Entzeroth, R., Kerckhoff, H. and Konig, A. (1992) Microneme secretion in Coccidia: confocal laser scanning and electron microscope study of Sarcocystis muris in cell culture. *Eur J Cell Biol*. **59**: 405-413.
- Escola, J.M., Kleijmeer, M.J., Stoorvogel, W., Griffith, J.M., Yoshie, O. and Geuze, H.J. (1998) Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem*. **273**: 20121-20127.
- Esko, J.D. and Selleck, S.B. (2002) Order out of chaos: assembly of ligand binding sites in heparan sulfate. *Annu Rev Biochem*. **71**: 435-471.
- Feigelson, S.W., Grabovsky, V., Shamri, R., Levy, S. and Alon, R. (2003) The CD81 tetraspanin facilitates instantaneous leukocyte VLA-4 adhesion strengthening to vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) under shear flow. *J Biol Chem*. **278**: 51203-51212.

- Fleming, T.J., Donnadieu, E., Song, C.H., Laethem, F.V., Galli, S.J. and Kinet, J.P. (1997) Negative regulation of Fc epsilon RI-mediated degranulation by CD81. *J Exp Med.* **186**: 1307-1314.
- Flint, M., Maidens, C., Loomis-Price, L.D., Shotton, C., Dubuisson, J., Monk, P., *et al* (1999) Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. *J Virol.* **73**: 6235-6244.
- Florens, L., Washburn, M.P., Raine, J.D., Anthony, R.M., Grainger, M., Haynes, J.D., *et al* (2002) A proteomic view of the Plasmodium falciparum life cycle. *Nature.* **419**: 520-526.
- Frevert, U. (2004) Sneaking in through the back entrance: the biology of malaria liver stages. *Trends Parasitol.* **20**: 417-424.
- Frevert, U., Sinnis, P., Esko, J.D. and Nussenzweig, V. (1996) Cell surface glycosaminoglycans are not obligatory for Plasmodium berghei sporozoite invasion in vitro. *Mol Biochem Parasitol.* **76**: 257-266.
- Frevert, U., Sinnis, P., Cerami, C., Shreffler, W., Takacs, B. and Nussenzweig, V. (1993) Malaria circumsporozoite protein binds to heparan sulfate proteoglycans associated with the surface membrane of hepatocytes. *J Exp Med.* **177**: 1287-1298.
- Frevert, U., Engelmann, S., Zougbede, S., Stange, J., Ng, B., Matuschewski, K., *et al* (2005) Intravital observation of Plasmodium berghei sporozoite infection of the liver. *PLoS Biol.* **3**: e192.
- Frischknecht, F., Baldacci, P., Martin, B., Zimmer, C., Thiberge, S., Olivo-Marin, J.C., *et al* (2004) Imaging movement of malaria parasites during transmission by Anopheles mosquitoes. *Cell Microbiol.* **6**: 687-694.
- Fukudome, K., Furuse, M., Imai, T., Nishimura, M., Takagi, S., Hinuma, Y. and Yoshie, O. (1992) Identification of membrane antigen C33 recognized by monoclonal antibodies inhibitory to human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)-induced syncytium formation: altered glycosylation of C33 antigen in HTLV-1-positive T cells. *J Virol.* **66**: 1394-1401.
- Gantt, S., Persson, C., Rose, K., Birkett, A.J., Abagyan, R. and Nussenzweig, V. (2000) Antibodies against thrombospondin-related anonymous protein do not inhibit Plasmodium sporozoite infectivity in vivo. *Infect Immun.* **68**: 3667-3673.
- Gardner, M.J., Hall, N., Fung, E., White, O., Berriman, M., Hyman, R.W., *et al* (2002) Genome sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Nature.* **419**: 498-511.
- Gaskins, E., Gilk, S., DeVore, N., Mann, T., Ward, G. and Beckers, C. (2004) Identification of the membrane receptor of a class XIV myosin in Toxoplasma gondii. *J Cell Biol.* **165**: 383-393.
- Gaur, D., Mayer, D.C. and Miller, L.H. (2004) Parasite ligand-host receptor interactions during invasion of erythrocytes by Plasmodium merozoites. *Int J Parasitol.* **34**: 1413-1429.

Gilberger, T.W., Thompson, J.K., Reed, M.B., Good, R.T. and Cowman, A.F. (2003) The cytoplasmic domain of the Plasmodium falciparum ligand EBA-175 is essential for invasion but not protein trafficking. *J Cell Biol.* **162**: 317-327.

Godson, G.N., Ellis, J., Svec, P., Schlesinger, D.H. and Nussenzweig, V. (1983) Identification and chemical synthesis of a tandemly repeated immunogenic region of Plasmodium knowlesi circumsporozoite protein. *Nature.* **305**: 29-33.

Goldberg, A.F., Moritz, O.L. and Molday, R.S. (1995) Heterologous expression of photoreceptor peripherin/rds and Rom-1 in COS-1 cells: assembly, interactions, and localization of multisubunit complexes. *Biochemistry.* **34**: 14213-14219.

Golenda, C.F., Starkweather, W.H. and Wirtz, R.A. (1990) The distribution of circumsporozoite protein (CS) in Anopheles stephensi mosquitoes infected with Plasmodium falciparum malaria. *J Histochem Cytochem.* **38**: 475-481.

Good, M.F. (2001) Towards a blood-stage vaccine for malaria: are we following all the leads? *Nat Rev Immunol.* **1**: 117-125.

Gourgues, M., Brunet-Simon, A., Lebrun, M.H. and Levis, C. (2004) The tetraspanin BcPls1 is required for appressorium-mediated penetration of Botrytis cinerea into host plant leaves. *Mol Microbiol.* **51**: 619-629.

Gourgues, M., Clergeot, P.H., Veneault, C., Cots, J., Sibuet, S., Brunet-Simon, A., *et al* (2002) A new class of tetraspanins in fungi. *Biochem Biophys Res Commun.* **297**: 1197-1204.

Gressner, A.M. and Schafer, S. (1989) Comparison of sulphated glycosaminoglycan and hyaluronate synthesis and secretion in cultured hepatocytes, fat storing cells, and Kupffer cells. *J Clin Chem Clin Biochem.* **27**: 141-149.

Gruner, A.C., Brahimi, K., Letourneur, F., Renia, L., Eling, W., Snounou, G. and Druilhe, P. (2001) Expression of the erythrocyte-binding antigen 175 in sporozoites and in liver stages of Plasmodium falciparum. *J Infect Dis.* **184**: 892-897.

Gutierrez-Lopez, M.D., Ovalle, S., Yanez-Mo, M., Sanchez-Sanchez, N., Rubinstein, E., Olmo, N., *et al* (2003) A functionally relevant conformational epitope on the CD9 tetraspanin depends on the association with activated beta1 integrin. *J Biol Chem.* **278**: 208-218.

Hakansson, S., Charron, A.J. and Sibley, L.D. (2001) Toxoplasma evacuoles: a two-step process of secretion and fusion forms the parasitophorous vacuole. *Embo J.* **20**: 3132-3144.

Hall, N., Karras, M., Raine, J.D., Carlton, J.M., Kooij, T.W., Berriman, M., *et al* (2005) A comprehensive survey of the Plasmodium life cycle by genomic, transcriptomic, and proteomic analyses. *Science.* **307**: 82-86.

Han, Y.S., Thompson, J., Kafatos, F.C. and Barillas-Mury, C. (2000) Molecular interactions between Anopheles stephensi midgut cells and Plasmodium berghei: the time bomb theory of ookinete invasion of mosquitoes. *Embo J.* **19**: 6030-6040.

Hasuwa, H., Shishido, Y., Yamazaki, A., Kobayashi, T., Yu, X. and Mekada, E. (2001) CD9 amino acids critical for upregulation of diphtheria toxin binding. *Biochem Biophys Res Commun.* **289**: 782-790.

Hehl, A.B., Lekutis, C., Grigg, M.E., Bradley, P.J., Dubremetz, J.F., Ortega-Barria, E. and Boothroyd, J.C. (2000) Toxoplasma gondii homologue of plasmodium apical membrane antigen 1 is involved in invasion of host cells. *Infect Immun.* **68**: 7078-7086.

Heintzelman, M.B. and Schwartzman, J.D. (1997) A novel class of unconventional myosins from Toxoplasma gondii. *J Mol Biol.* **271**: 139-146.

Hemler, M.E. (2003) Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **19**: 397-422.

Herm-Gotz, A., Weiss, S., Stratmann, R., Fujita-Becker, S., Ruff, C., Meyhofer, E., *et al* (2002) Toxoplasma gondii myosin A and its light chain: a fast, single-headed, plus-end-directed motor. *Embo J.* **21**: 2149-2158.

Higashiyama, S., Iwamoto, R., Goishi, K., Raab, G., Taniguchi, N., Klagsbrun, M. and Mekada, E. (1995) The membrane protein CD9/DRAP 27 potentiates the juxtacrine growth factor activity of the membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. *J Cell Biol.* **128**: 929-938.

Higginbottom, A., Takahashi, Y., Bolling, L., Coonrod, S.A., White, J.M., Partridge, L.J. and Monk, P.N. (2003) Structural requirements for the inhibitory action of the CD9 large extracellular domain in sperm/oocyte binding and fusion. *Biochem Biophys Res Commun.* **311**: 208-214.

Higginbottom, A., Quinn, E.R., Kuo, C.C., Flint, M., Wilson, L.H., Bianchi, E., *et al* (2000) Identification of amino acid residues in CD81 critical for interaction with hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *J Virol.* **74**: 3642-3649.

Hoffman, S.L. and Doolan, D.L. (2000) Malaria vaccines-targeting infected hepatocytes. *Nat Med.* **6**: 1218-1219.

Hoffman, S.L., Rogers, W.O., Carucci, D.J. and Venter, J.C. (1998) From genomics to vaccines: malaria as a model system. *Nat Med.* **4**: 1351-1353.

Hollingdale, M.R., Leland, P. and Schwartz, A.L. (1983) In vitro cultivation of the exoerythrocytic stage of Plasmodium berghei in a hepatoma cell line. *Am J Trop Med Hyg.* **32**: 682-684.

Hollingdale, M.R., Collins, W.E., Campbell, C.C. and Schwartz, A.L. (1985) In vitro culture of two populations (dividing and nondividing) of exoerythrocytic parasites of Plasmodium vivax. *Am J Trop Med Hyg.* **34**: 216-222.

Hollingdale, M.R., Nardin, E.H., Tharavanij, S., Schwartz, A.L. and Nussenzweig, R.S. (1984) Inhibition of entry of Plasmodium falciparum and P. vivax sporozoites into cultured cells; an in vitro assay of protective antibodies. *J Immunol.* **132**: 909-913.

Holt, G.D., Pangburn, M.K. and Ginsburg, V. (1990) Properdin binds to sulfatide [Gal(3-SO₄) β 1-1 Cer] and has a sequence homology with other proteins that bind sulfated glycoconjugates. *J Biol Chem.* **265**: 2852-2855.

Horvath, G., Serru, V., Clay, D., Billard, M., Boucheix, C. and Rubinstein, E. (1998) CD19 is linked to the integrin-associated tetraspans CD9, CD81, and CD82. *J Biol Chem.* **273**: 30537-30543.

Hotta, H., Ross, A.H., Huebner, K., Isobe, M., Wendeborn, S., Chao, M.V., *et al* (1988) Molecular cloning and characterization of an antigen associated with early stages of melanoma tumor progression. *Cancer Res.* **48**: 2955-2962.

Hsu, M., Zhang, J., Flint, M., Logvinoff, C., Cheng-Mayer, C., Rice, C.M. and McKeating, J.A. (2003) Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**: 7271-7276.

Hu, C.C., Liang, F.X., Zhou, G., Tu, L., Tang, C.H., Zhou, J., *et al* (2005) Assembly of urothelial plaques: tetraspanin function in membrane protein trafficking. *Mol Biol Cell.* **16**: 3937-3950.

Huang, S., Yuan, S., Dong, M., Su, J., Yu, C., Shen, Y., *et al* (2005) The phylogenetic analysis of tetraspanins projects the evolution of cell-cell interactions from unicellular to multicellular organisms. *Genomics.*

Hynes, R.O. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* **110**: 673-687.

Ikeyama, S., Koyama, M., Yamaoko, M., Sasada, R. and Miyake, M. (1993) Suppression of cell motility and metastasis by transfection with human motility-related protein (MRP-1/CD9) DNA. *J Exp Med.* **177**: 1231-1237.

Imai, T. and Yoshie, O. (1993) C33 antigen and M38 antigen recognized by monoclonal antibodies inhibitory to syncytium formation by human T cell leukemia virus type 1 are both members of the transmembrane 4 superfamily and associate with each other and with CD4 or CD8 in T cells. *J Immunol.* **151**: 6470-6481.

Imai, T., Kakizaki, M., Nishimura, M. and Yoshie, O. (1995) Molecular analyses of the association of CD4 with two members of the transmembrane 4 superfamily, CD81 and CD82. *J Immunol.* **155**: 1229-1239.

Imai, T., Fukudome, K., Takagi, S., Nagira, M., Furuse, M., Fukuhara, N., *et al* (1992) C33 antigen recognized by monoclonal antibodies inhibitory to human T cell leukemia virus type 1-induced syncytium formation is a member of a new family of transmembrane proteins including CD9, CD37, CD53, and CD63. *J Immunol.* **149**: 2879-2886.

Inui, S., Higashiyama, S., Hashimoto, K., Higashiyama, M., Yoshikawa, K. and Taniguchi, N. (1997) Possible role of coexpression of CD9 with membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor and amphiregulin in cultured human keratinocyte growth. *J Cell Physiol.* **171**: 291-298.

Ishino, T., Chinzei, Y. and Yuda, M. (2005a) A Plasmodium sporozoite protein with a membrane attack complex domain is required for breaching the liver sinusoidal cell layer prior to hepatocyte infection. *Cell Microbiol.* **7**: 199-208.

Ishino, T., Chinzei, Y. and Yuda, M. (2005b) Two proteins with 6-cys motifs are required for malarial parasites to commit to infection of the hepatocyte. *Mol Microbiol.* **in press**.

Ishino, T., Chinzei, Y. and Yuda, M. (2005c) Two proteins with 6-cys motifs are required for malarial parasites to commit to infection of the hepatocyte. *Mol Microbiol.* **58**: 1264-1275.

Ishino, T., Yano, K., Chinzei, Y. and Yuda, M. (2004) Cell-passage activity is required for the malarial parasite to cross the liver sinusoidal cell layer. *PLoS Biol.* **2**: E4.

Iwamoto, R., Higashiyama, S., Mitamura, T., Taniguchi, N., Klagsbrun, M. and Mekada, E. (1994) Heparin-binding EGF-like growth factor, which acts as the diphtheria toxin receptor, forms a complex with membrane protein DRAP27/CD9, which up-regulates functional receptors and diphtheria toxin sensitivity. *Embo J.* **13**: 2322-2330.

Jethwaney, D., Lepore, T., Hassan, S., Mello, K., Rangarajan, R., Jahnen-Dechent, W., *et al* (2005) Fetuin-A, a hepatocyte-specific protein that binds Plasmodium berghei thrombospondin-related adhesive protein: a potential role in infectivity. *Infect Immun.* **73**: 5883-5891.

Jewett, T.J. and Sibley, L.D. (2003) Aldolase forms a bridge between cell surface adhesins and the actin cytoskeleton in apicomplexan parasites. *Mol Cell.* **11**: 885-894.

Jones, P.H., Bishop, L.A. and Watt, F.M. (1996) Functional significance of CD9 association with beta 1 integrins in human epidermal keratinocytes. *Cell Adhes Commun.* **4**: 297-305.

Jongwutiwes, S., Putaporntip, C., Iwasaki, T., Sata, T. and Kanbara, H. (2004) Naturally acquired Plasmodium knowlesi malaria in human, Thailand. *Emerg Infect Dis.* **10**: 2211-2213.

Kaiser, K., Camargo, N. and Kappe, S.H. (2003) Transformation of sporozoites into early exoerythrocytic malaria parasites does not require host cells. *J Exp Med.* **197**: 1045-1050.

Kaiser, K., Matuschewski, K., Camargo, N., Ross, J. and Kappe, S.H. (2004) Differential transcriptome profiling identifies Plasmodium genes encoding pre-erythrocytic stage-specific proteins. *Mol Microbiol.* **51**: 1221-1232.

Kaji, K., Oda, S., Miyazaki, S. and Kudo, A. (2002) Infertility of CD9-deficient mouse eggs is reversed by mouse CD9, human CD9, or mouse CD81; polyadenylated mRNA injection developed for molecular analysis of sperm-egg fusion. *Dev Biol.* **247**: 327-334.

Kaji, K., Oda, S., Shikano, T., Ohnuki, T., Uematsu, Y., Sakagami, J., *et al* (2000) The gamete fusion process is defective in eggs of Cd9-deficient mice. *Nat Genet.* **24**: 279-282.

Kappe, S., Bruderer, T., Gantt, S., Fujioka, H., Nussenzweig, V. and Menard, R. (1999) Conservation of a gliding motility and cell invasion machinery in Apicomplexan parasites. *J Cell Biol.* **147**: 937-944.

Kappe, S.H., Buscaglia, C.A. and Nussenzweig, V. (2004) Plasmodium Sporozoite Molecular Cell Biology. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **20**: 29-59.

Kappe, S.H., Noe, A.R., Fraser, T.S., Blair, P.L. and Adams, J.H. (1998) A family of chimeric erythrocyte binding proteins of malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**: 1230-1235.

Kappe, S.H., Gardner, M.J., Brown, S.M., Ross, J., Matuschewski, K., Ribeiro, J.M., *et al* (2001) Exploring the transcriptome of the malaria sporozoite stage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**: 9895-9900.

Karamatic Crew, V., Burton, N., Kagan, A., Green, C.A., Levene, C., Flinter, F., *et al* (2004) CD151, the first member of the tetraspanin (TM4) superfamily detected on erythrocytes, is essential for the correct assembly of human basement membranes in kidney and skin. *Blood.* **104**: 2217-2223.

Kariu, T., Yuda, M., Yano, K. and Chinzei, Y. (2002) MAEBL is essential for malarial sporozoite infection of the mosquito salivary gland. *J Exp Med.* **195**: 1317-1323.

Kazarov, A.R., Yang, X., Stipp, C.S., Sehgal, B. and Hemler, M.E. (2002) An extracellular site on tetraspanin CD151 determines alpha 3 and alpha 6 integrin-dependent cellular morphology. *J Cell Biol.* **158**: 1299-1309.

King, C.A. (1988) Cell motility of sporozoan protozoa. *Parasitol Today.* **4**: 315-319.

Kitadokoro, K., Bordo, D., Galli, G., Petracca, R., Falugi, F., Abrignani, S., *et al* (2001) CD81 extracellular domain 3D structure: insight into the tetraspanin superfamily structural motifs. *Embo J.* **20**: 12-18.

Klosek, S.K., Nakashiro, K., Hara, S., Shintani, S., Hasegawa, H. and Hamakawa, H. (2005) CD151 forms a functional complex with c-Met in human salivary gland cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **336**: 408-416.

Knobeloch, K.P., Wright, M.D., Ochsenbein, A.F., Liesenfeld, O., Lohler, J., Zinkernagel, R.M., *et al* (2000) Targeted inactivation of the tetraspanin CD37 impairs T-cell-dependent B-cell response under suboptimal costimulatory conditions. *Mol Cell Biol.* **20**: 5363-5369.

Kohl, S., Christ-Adler, M., Apfelstedt-Sylla, E., Kellner, U., Eckstein, A., Zrenner, E. and Wissinger, B. (1997) RDS/peripherin gene mutations are frequent causes of central retinal dystrophies. *J Med Genet.* **34**: 620-626.

Kolesnikova, T.V., Stipp, C.S., Rao, R.M., Lane, W.S., Luscinskas, F.W. and Hemler, M.E. (2004) EWI-2 modulates lymphocyte integrin alpha4beta1 functions. *Blood.* **103**: 3013-3019.

Kovalenko, O.V., Yang, X., Kolesnikova, T.V. and Hemler, M.E. (2004) Evidence for specific tetraspanin homodimers: inhibition of palmitoylation makes cysteine residues available for cross-linking. *Biochem J.* **377**: 407-417.

Kronenberger, B., Sarrazin, C., Hofmann, W.P., von Wagner, M., Herrmann, E., Welsch, C., *et al* (2004) Mutations in the putative HCV-E2 CD81 binding regions and correlation with cell surface CD81 expression. *J Viral Hepat.* **11**: 310-318.

Lagaudriere-Gesbert, C., Lebel-Binay, S., Hubeau, C., Fradelizi, D. and Conjeaud, H. (1998) Signaling through the tetraspanin CD82 triggers its association with the cytoskeleton leading to sustained morphological changes and T cell activation. *Eur J Immunol.* **28**: 4332-4344.

Lagaudriere-Gesbert, C., Le Naour, F., Lebel-Binay, S., Billard, M., Lemichez, E., Boquet, P., *et al* (1997) Functional analysis of four tetraspans, CD9, CD53, CD81, and CD82, suggests a common role in costimulation, cell adhesion, and migration: only CD9 upregulates HB-EGF activity. *Cell Immunol.* **182**: 105-112.

Lammerding, J., Kazarov, A.R., Huang, H., Lee, R.T. and Hemler, M.E. (2003) Tetraspanin CD151 regulates alpha6beta1 integrin adhesion strengthening. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**: 7616-7621.

Landau, I. and Killick-Kendrick, R. (1966) Rodent plasmodia of the Republique Centrafricaine: the sporogony and tissue stages of *Plasmodium chabaudi* and *P. berghei yoelii*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **60**: 633-649.

Lauer, S., VanWye, J., Harrison, T., McManus, H., Samuel, B.U., Hiller, N.L., *et al* (2000) Vacuolar uptake of host components, and a role for cholesterol and sphingomyelin in malarial infection. *Embo J.* **19**: 3556-3564.

Lavillette, D., Bartosch, B., Nourrisson, D., Verney, G., Cosset, F.L., Penin, F. and Pecheur, E.I. (2005a) Hepatitis C virus glycoproteins mediate low pH-dependent membrane fusion with liposomes. *J Biol Chem.*

Lavillette, D., Tarr, A.W., Voisset, C., Donot, P., Bartosch, B., Bain, C., *et al* (2005b) Characterization of host-range and cell entry properties of the major genotypes and subtypes of hepatitis C virus. *Hepatology.* **41**: 265-274.

Le Naour, F., Rubinstein, E., Jasmin, C., Prenant, M. and Boucheix, C. (2000) Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science.* **287**: 319-321.

Le Roch, K.G., Zhou, Y., Blair, P.L., Grainger, M., Moch, J.K., Haynes, J.D., *et al* (2003) Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle. *Science.* **301**: 1503-1508.

Lebrun, M., Michelin, A., El Hajj, H., Poncet, J., Bradley, P.J., Vial, H. and Dubremetz, J.F. (2005) The rhoptry neck protein RON4 relocalizes at the moving junction during *Toxoplasma gondii* invasion. *Cell Microbiol.* **7**: 1823-1833.

Lebrun, M., Michelin, A., El Hajj, H., Poncet, J., Bradley, P., Vial, H. and Dubremetz, J.F. (In Press) The rhoptry neck protein RON4 relocalizes at the moving junction during *Toxoplasma gondii* invasion. *Cell Microbiol.*

Leiriao, P., Albuquerque, S.S., Corso, S., van Gemert, G.J., Sauerwein, R.W., Rodriguez, A., *et al* (2005) HGF/MET signalling protects Plasmodium-infected host cells from apoptosis. *Cell Microbiol.* **7**: 603-609.

Levy, S. and Shoham, T. (2005) The tetraspanin web modulates immune-signalling complexes. *Nat Rev Immunol.* **5**: 136-148.

- Levy, S., Nguyen, V.Q., Andria, M.L. and Takahashi, S. (1991) Structure and membrane topology of TAPA-1. *J Biol Chem.* **266**: 14597-14602.
- Lindenbach, B.D., Evans, M.J., Syder, A.J., Wolk, B., Tellinghuisen, T.L., Liu, C.C., *et al* (2005) Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science.* **309**: 623-626.
- Lingelbach, K. and Joiner, K.A. (1998) The parasitophorous vacuole membrane surrounding Plasmodium and Toxoplasma: an unusual compartment in infected cells. *J Cell Sci.* **111** (Pt **11**): 1467-1475.
- Little, K.D., Hemler, M.E. and Stipp, C.S. (2004) Dynamic regulation of a GPCR-tetraspanin-G protein complex on intact cells: central role of CD81 in facilitating GPR56-Galpha q/11 association. *Mol Biol Cell.* **15**: 2375-2387.
- Loffler, S., Lottspeich, F., Lanza, F., Azorsa, D.O., ter Meulen, V. and Schneider-Schaulies, J. (1997) CD9, a tetraspan transmembrane protein, renders cells susceptible to canine distemper virus. *J Virol.* **71**: 42-49.
- Lycett, G.J. and Kafatos, F.C. (2002) Anti-malarial mosquitoes? *Nature.* **417**: 387-388.
- Lyon, M., Deakin, J.A. and Gallagher, J.T. (1994) Liver heparan sulfate structure. A novel molecular design. *J Biol Chem.* **269**: 11208-11215.
- Mackintosh, C.L., Beeson, J.G. and Marsh, K. (2004) Clinical features and pathogenesis of severe malaria. *Trends Parasitol.* **20**: 597-603.
- Maecker, H.T. and Levy, S. (1997) Normal lymphocyte development but delayed humoral immune response in CD81-null mice. *J Exp Med.* **185**: 1505-1510.
- Mahley, R.W. and Ji, Z.S. (1999) Remnant lipoprotein metabolism: key pathways involving cell-surface heparan sulfate proteoglycans and apolipoprotein E. *J Lipid Res.* **40**: 1-16.
- Manes, S., del Real, G. and Martinez, A.C. (2003) Pathogens: raft hijackers. *Nat Rev Immunol.* **3**: 557-568.
- Margos, G., Siden-Kiamos, I., Fowler, R.E., Gillman, T.R., Spaccapelo, R., Lycett, G., *et al* (2000) Myosin A expressions in sporogonic stages of Plasmodium. *Mol Biochem Parasitol.* **111**: 465-469.
- Marsh, K., Forster, D., Waruiru, C., Mwangi, I., Winstanley, M., Marsh, V., *et al* (1995) Indicators of life-threatening malaria in African children. *N Engl J Med.* **332**: 1399-1404.
- Marshall, P., Rohlmann, A., Nussenzweig, V., Herz, J. and Sinnis, P. (2000) Plasmodium sporozoites invade cells with targeted deletions in the LDL receptor related protein. *Mol Biochem Parasitol.* **106**: 293-298.
- Martin, F., Roth, D.M., Jans, D.A., Pouton, C.W., Partridge, L.J., Monk, P.N. and Moseley, G.W. (2005) Tetraspanins in viral infections: a fundamental role in viral biology? *J Virol.* **79**: 10839-10851.

Masciopinto, F., Freer, G., Burgio, V.L., Levy, S., Galli-Stampino, L., Bendinelli, M., *et al* (2002) Expression of human CD81 in transgenic mice does not confer susceptibility to hepatitis C virus infection. *Virology*. **304**: 187-196.

Masellis-Smith, A., Jensen, G.S., Seehafer, J.G., Slupsky, J.R. and Shaw, A.R. (1990) Anti-CD9 monoclonal antibodies induce homotypic adhesion of pre-B cell lines by a novel mechanism. *J Immunol*. **144**: 1607-1613.

Matsumoto, A.K., Martin, D.R., Carter, R.H., Klickstein, L.B., Ahearn, J.M. and Fearon, D.T. (1993) Functional dissection of the CD21/CD19/TAPA-1/Leu-13 complex of B lymphocytes. *J Exp Med*. **178**: 1407-1417.

Matsuoka, H., Yoshida, S., Hirai, M. and Ishii, A. (2002) A rodent malaria, *Plasmodium berghei*, is experimentally transmitted to mice by merely probing of infective mosquito, *Anopheles stephensi*. *Parasitol Int*. **51**: 17-23.

Matuschewski, K., Nunes, A.C., Nussenzweig, V. and Menard, R. (2002a) *Plasmodium* sporozoite invasion into insect and mammalian cells is directed by the same dual binding system. *Embo J*. **21**: 1597-1606.

Matuschewski, K., Mota, M.M., Pinder, J.C., Nussenzweig, V. and Kappe, S.H. (2001) Identification of the class XIV myosins Pb-MyoA and Py-MyoA and expression in *Plasmodium* sporozoites. *Mol Biochem Parasitol*. **112**: 157-161.

Matuschewski, K., Ross, J., Brown, S.M., Kaiser, K., Nussenzweig, V. and Kappe, S.H. (2002b) Infectivity-associated changes in the transcriptional repertoire of the malaria parasite sporozoite stage. *J Biol Chem*. **277**: 41948-41953.

Mazier, D. (1991) Malaria antigens expressed on the surface of infected hepatocytes: a role in protective immunity? *Res Immunol*. **142**: 658-662.

Mazier, D., Landau, I., Miltgen, F., Druilhe, P., Lambiotte, M., Baccam, D. and Gentilini, M. (1982) [In vitro infestation of adult *thamnomys* hepatocytes with *Plasmodium yoelii* sporozoites; schizogony and release of infecting merozoites]. *C R Seances Acad Sci III*. **294**: 963-965.

Mazier, D., Landau, I., Druilhe, P., Miltgen, F., Guguen-Guillouzo, C., Baccam, D., *et al* (1984) Cultivation of the liver forms of *Plasmodium vivax* in human hepatocytes. *Nature*. **307**: 367-369.

Mazier, D., Beaudoin, R.L., Mellouk, S., Druilhe, P., Texier, B., Trosper, J., *et al* (1985) Complete development of hepatic stages of *Plasmodium falciparum* in vitro. *Science*. **227**: 440-442.

Mazurov, D., Heidecker, G. and Derse, D. (2005) HTLV-1 Gag protein associates with CD82 tetraspanin microdomains at the plasma membrane. *Virology*.

McCormick, C.J., Tuckwell, D.S., Crisanti, A., Humphries, M.J. and Hollingdale, M.R. (1999) Identification of heparin as a ligand for the A-domain of *Plasmodium falciparum* thrombospondin-related adhesion protein. *Mol Biochem Parasitol*. **100**: 111-124.

McCutchan, T.F., Kissinger, J.C., Touray, M.G., Rogers, M.J., Li, J., Sullivan, M., *et al* (1996) Comparison of circumsporozoite proteins from avian and mammalian malaras: biological and phylogenetic implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**: 11889-11894.

McKeating, J.A., Zhang, L.Q., Logvinoff, C., Flint, M., Zhang, J., Yu, J., *et al* (2004) Diverse hepatitis C virus glycoproteins mediate viral infection in a CD81-dependent manner. *J Virol*. **78**: 8496-8505.

Meis, J.F., Verhave, J.P., Jap, P.H. and Meuwissen, J.H. (1983a) An ultrastructural study on the role of Kupffer cells in the process of infection by *Plasmodium berghei* sporozoites in rats. *Parasitology*. **86** (Pt 2): 231-242.

Meis, J.F., Verhave, J.P., Jap, P.H., Sinden, R.E. and Meuwissen, J.H. (1983b) Ultrastructural observations on the infection of rat liver by *Plasmodium berghei* sporozoites in vivo. *J Protozool*. **30**: 361-366.

Meis, J.F., Ponnudurai, T., Mons, B., van Belkum, A., van Eerd, P.M., Druilhe, P. and Schellekens, H. (1990) *Plasmodium falciparum*: studies on mature exoerythrocytic forms in the liver of the chimpanzee, *Pan troglodytes*. *Exp Parasitol*. **70**: 1-11.

Meissner, M., Schluter, D. and Soldati, D. (2002) Role of *Toxoplasma gondii* myosin A in powering parasite gliding and host cell invasion. *Science*. **298**: 837-840.

Menard, R. (2000) The journey of the malaria sporozoite through its hosts: two parasite proteins lead the way. *Microbes Infect*. **2**: 633-642.

Menard, R. (2001) Gliding motility and cell invasion by Apicomplexa: insights from the *Plasmodium* sporozoite. *Cell Microbiol*. **3**: 63-73.

Menard, R. and Janse, C. (1997) Gene targeting in malaria parasites. *Methods*. **13**: 148-157.

Menard, R., Sultan, A.A., Cortes, C., Altszuler, R., van Dijk, M.R., Janse, C.J., *et al* (1997) Circumsporozoite protein is required for development of malaria sporozoites in mosquitoes. *Nature*. **385**: 336-340.

Michishita, M., Videm, V. and Arnaout, M.A. (1993) A novel divalent cation-binding site in the A domain of the beta 2 integrin CR3 (CD11b/CD18) is essential for ligand binding. *Cell*. **72**: 857-867.

Miller, L.H. and Hoffman, S.L. (1998) Research toward vaccines against malaria. *Nat Med*. **4**: 520-524.

Miller, L.H., Aikawa, M., Johnson, J.G. and Shiroishi, T. (1979) Interaction between cytochalasin B-treated malarial parasites and erythrocytes. Attachment and junction formation. *J Exp Med*. **149**: 172-184.

Millet, P., Atkinson, C.T., Aikawa, M., Hollingdale, M.R. and Collins, W.E. (1991) Strain specificity in the liver-stage development of *Plasmodium falciparum* in primary cultures of new world monkey hepatocytes. *Am J Trop Med Hyg*. **45**: 236-242.

- Min, G., Zhou, G., Schapira, M., Sun, T.T. and Kong, X.P. (2003) Structural basis of urothelial permeability barrier function as revealed by Cryo-EM studies of the 16 nm uropod particle. *J Cell Sci.* **116**: 4087-4094.
- Mital, J., Meissner, M., Soldati, D. and Ward, G.E. (2005) Conditional expression of Toxoplasma gondii apical membrane antigen-1 (TgAMA1) demonstrates that TgAMA1 plays a critical role in host cell invasion. *Mol Biol Cell.* **16**: 4341-4349.
- Miyado, K., Yamada, G., Yamada, S., Hasuwa, H., Nakamura, Y., Ryu, F., *et al* (2000) Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science.* **287**: 321-324.
- Miyake, M., Koyama, M., Seno, M. and Ikeyama, S. (1991) Identification of the motility-related protein (MRP-1), recognized by monoclonal antibody M31-15, which inhibits cell motility. *J Exp Med.* **174**: 1347-1354.
- Miyazaki, T., Muller, U. and Campbell, K.S. (1997) Normal development but differentially altered proliferative responses of lymphocytes in mice lacking CD81. *Embo J.* **16**: 4217-4225.
- Mordue, D.G., Desai, N., Dustin, M. and Sibley, L.D. (1999) Invasion by Toxoplasma gondii establishes a moving junction that selectively excludes host cell plasma membrane proteins on the basis of their membrane anchoring. *J Exp Med.* **190**: 1783-1792.
- Morelli, A.E., Larregina, A.T., Shufesky, W.J., Sullivan, M.L., Stolz, D.B., Papworth, G.D., *et al* (2004) Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood.* **104**: 3257-3266.
- Morisaki, J.H., Heuser, J.E. and Sibley, L.D. (1995) Invasion of Toxoplasma gondii occurs by active penetration of the host cell. *J Cell Sci.* **108 (Pt 6)**: 2457-2464.
- Morrisette, N.S. and Sibley, L.D. (2002) Cytoskeleton of apicomplexan parasites. *Microbiol Mol Biol Rev.* **66**: 21-38; table of contents.
- Mota, M.M. and Rodriguez, A. (2000) Plasmodium yoelii: efficient in vitro invasion and complete development of sporozoites in mouse hepatic cell lines. *Exp Parasitol.* **96**: 257-259.
- Mota, M.M., Hafalla, J.C. and Rodriguez, A. (2002) Migration through host cells activates Plasmodium sporozoites for infection. *Nat Med.* **8**: 1318-1322.
- Mota, M.M., Thathy, V., Nussenzweig, R.S. and Nussenzweig, V. (2001a) Gene targeting in the rodent malaria parasite Plasmodium yoelii. *Mol Biochem Parasitol.* **113**: 271-278.
- Mota, M.M., Pradel, G., Vanderberg, J.P., Hafalla, J.C., Frevert, U., Nussenzweig, R.S., *et al* (2001b) Migration of Plasmodium sporozoites through cells before infection. *Science.* **291**: 141-144.
- Mueller, A.K., Labaied, M., Kappe, S.H. and Matuschewski, K. (2005a) Genetically modified Plasmodium parasites as a protective experimental malaria vaccine. *Nature.* **433**: 164-167.

Mueller, A.K., Camargo, N., Kaiser, K., Andorfer, C., Frevet, U., Matuschewski, K. and Kappe, S.H. (2005b) Plasmodium liver stage developmental arrest by depletion of a protein at the parasite-host interface. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102**: 3022-3027.

Muller, H.M., Reckmann, I., Hollingdale, M.R., Bujard, H., Robson, K.J. and Crisanti, A. (1993) Thrombospondin related anonymous protein (TRAP) of Plasmodium falciparum binds specifically to sulfated glycoconjugates and to HepG2 hepatoma cells suggesting a role for this molecule in sporozoite invasion of hepatocytes. *Embo J*. **12**: 2881-2889.

Myung, J.M., Marshall, P. and Sinnis, P. (2004) The Plasmodium circumsporozoite protein is involved in mosquito salivary gland invasion by sporozoites. *Mol Biochem Parasitol*. **133**: 53-59.

Nakamura, K., Mitamura, T., Takahashi, T., Kobayashi, T. and Mekada, E. (2000) Importance of the major extracellular domain of CD9 and the epidermal growth factor (EGF)-like domain of heparin-binding EGF-like growth factor for up-regulation of binding and activity. *J Biol Chem*. **275**: 18284-18290.

Nishiuchi, R., Sanzen, N., Nada, S., Sumida, Y., Wada, Y., Okada, M., *et al* (2005) Potentiation of the ligand-binding activity of integrin $\alpha_3\beta_1$ via association with tetraspanin CD151. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102**: 1939-1944.

Noe, A.R. and Adams, J.H. (1998) Plasmodium yoelii YM MAEBL protein is coexpressed and colocalizes with rhoptry proteins. *Mol Biochem Parasitol*. **96**: 27-35.

Nussenzweig, R.S., Vanderberg, J., Most, H. and Orton, C. (1967) Protective immunity produced by the injection of x-irradiated sporozoites of plasmodium berghei. *Nature*. **216**: 160-162.

Nussenzweig, V. (1997) Malaria sporozoites and chylomicron remnants compete for binding sites in the liver. *Behring Inst Mitt*: 85-89.

Nussenzweig, V. and Nussenzweig, R.S. (1985) Circumsporozoite proteins of malaria parasites. *Cell*. **42**: 401-403.

Odintsova, E., Voortman, J., Gilbert, E. and Berditchevski, F. (2003) Tetraspanin CD82 regulates compartmentalisation and ligand-induced dimerization of EGFR. *J Cell Sci*. **116**: 4557-4566.

O'Donnell, R.A. and Blackman, M.J. (2005) The role of malaria merozoite proteases in red blood cell invasion. *Curr Opin Microbiol*. **8**: 422-427.

Ono, M., Handa, K., Sonnino, S., Withers, D.A., Nagai, H. and Hakomori, S. (2001) GM3 ganglioside inhibits CD9-facilitated haptotactic cell motility: coexpression of GM3 and CD9 is essential in the downregulation of tumor cell motility and malignancy. *Biochemistry*. **40**: 6414-6421.

Opitz, C. and Soldati, D. (2002) 'The glideosome': a dynamic complex powering gliding motion and host cell invasion by Toxoplasma gondii. *Mol Microbiol*. **45**: 597-604.

Oren, R., Takahashi, S., Doss, C., Levy, R. and Levy, S. (1990) TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins. *Mol Cell Biol.* **10**: 4007-4015.

Pancake, S.J., Holt, G.D., Mellouk, S. and Hoffman, S.L. (1992) Malaria sporozoites and circumsporozoite proteins bind specifically to sulfated glycoconjugates. *J Cell Biol.* **117**: 1351-1357.

Pasamontes, L., Hug, D., Humbelin, M. and Weber, G. (1993) Sequence of a major Eimeria maxima antigen homologous to the Eimeria tenella microneme protein Etp100. *Mol Biochem Parasitol.* **57**: 171-174.

Pelchen-Matthews, A., Kramer, B. and Marsh, M. (2003) Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *J Cell Biol.* **162**: 443-455.

Petracca, R., Falugi, F., Galli, G., Norais, N., Rosa, D., Campagnoli, S., *et al* (2000) Structure-function analysis of hepatitis C virus envelope-CD81 binding. *J Virol.* **74**: 4824-4830.

Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., *et al* (1998) Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science.* **282**: 938-941.

Pimenta, P.F., Touray, M. and Miller, L. (1994) The journey of malaria sporozoites in the mosquito salivary gland. *J Eukaryot Microbiol.* **41**: 608-624.

Pinder, J.C., Fowler, R.E., Dluzewski, A.R., Bannister, L.H., Lavin, F.M., Mitchell, G.H., *et al* (1998) Actomyosin motor in the merozoite of the malaria parasite, Plasmodium falciparum: implications for red cell invasion. *J Cell Sci.* **111 (Pt 13)**: 1831-1839.

Pino, P., Taoufiq, Z., Nitchou, J., Vouldoukis, I. and Mazier, D. (2005) Blood-brain barrier breakdown during cerebral malaria: suicide or murder? *Thromb Haemost.* **94**: 336-340.

Pinzon-Ortiz, C., Friedman, J., Esko, J. and Sinnis, P. (2001) The binding of the circumsporozoite protein to cell surface heparan sulfate proteoglycans is required for plasmodium sporozoite attachment to target cells. *J Biol Chem.* **276**: 26784-26791.

Pique, C., Lagaudriere-Gesbert, C., Delamarre, L., Rosenberg, A.R., Conjeaud, H. and Dokhelar, M.C. (2000) Interaction of CD82 tetraspanin proteins with HTLV-1 envelope glycoproteins inhibits cell-to-cell fusion and virus transmission. *Virology.* **276**: 455-465.

Ponnudurai, T., Meuwissen, J.H., Leeuwenberg, A.D., Verhave, J.P. and Lensen, A.H. (1982) The production of mature gametocytes of Plasmodium falciparum in continuous cultures of different isolates infective to mosquitoes. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **76**: 242-250.

Ponnudurai, T., Lensen, A.H., van Gemert, G.J., Bolmer, M.G. and Meuwissen, J.H. (1991) Feeding behaviour and sporozoite ejection by infected Anopheles stephensi. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **85**: 175-180.

Posthuma, G., Meis, J.F., Verhave, J.P., Gigengack, S., Hollingdale, M.R., Ponnudurai, T. and Geuze, H.J. (1989) Immunogold determination of Plasmodium falciparum circumsporozoite protein in Anopheles stephensi salivary gland cells. *Eur J Cell Biol.* **49**: 66-72.

Poupel, O., Boleti, H., Axisa, S., Couture-Tosi, E. and Tardieux, I. (2000) Toxofilin, a novel actin-binding protein from Toxoplasma gondii, sequesters actin monomers and caps actin filaments. *Mol Biol Cell.* **11**: 355-368.

Pradel, G. and Frevert, U. (2001) Malaria sporozoites actively enter and pass through rat Kupffer cells prior to hepatocyte invasion. *Hepatology.* **33**: 1154-1165.

Pradel, G., Garapaty, S. and Frevert, U. (2002) Proteoglycans mediate malaria sporozoite targeting to the liver. *Mol Microbiol.* **45**: 637-651.

Preiser, P., Kaviratne, M., Khan, S., Bannister, L. and Jarra, W. (2000) The apical organelles of malaria merozoites: host cell selection, invasion, host immunity and immune evasion. *Microbes Infect.* **2**: 1461-1477.

Preiser, P.R., Khan, S., Costa, F.T., Jarra, W., Belnoue, E., Ogun, S., *et al* (2002) Stage-specific transcription of distinct repertoires of a multigene family during Plasmodium life cycle. *Science.* **295**: 342-345.

Qi, J.C., Wang, J., Mandadi, S., Tanaka, K., Roufogalis, B.D., Madigan, M.C., *et al* (2005) Human and Mouse Mast Cells Use the Tetraspanin CD9 as an Alternate Interleukin 16 Receptor. *Blood.*

Quinn, E.R., Chan, C.H., Hadlock, K.G., Fount, S.K., Flint, M. and Levy, S. (2001) The B-cell receptor of a hepatitis C virus (HCV)-associated non-Hodgkin lymphoma binds the viral E2 envelope protein, implicating HCV in lymphomagenesis. *Blood.* **98**: 3745-3749.

Radford, K.J., Mallesch, J. and Hersey, P. (1995) Suppression of human melanoma cell growth and metastasis by the melanoma-associated antigen CD63 (ME491). *Int J Cancer.* **62**: 631-635.

Radford, K.J., Thorne, R.F. and Hersey, P. (1997) Regulation of tumor cell motility and migration by CD63 in a human melanoma cell line. *J Immunol.* **158**: 3353-3358.

Raposo, G., Nijman, H.W., Stoorvogel, W., Liejendekker, R., Harding, C.V., Melief, C.J. and Geuze, H.J. (1996) B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *J Exp Med.* **183**: 1161-1172.

Rathore, D., McCutchan, T.F., Garboczi, D.N., Toida, T., Hernaiz, M.J., LeBrun, L.A., *et al* (2001) Direct measurement of the interactions of glycosaminoglycans and a heparin decasaccharide with the malaria circumsporozoite protein. *Biochemistry.* **40**: 11518-11524.

Renia, L., Miltgen, F., Charoenvit, Y., Ponnudurai, T., Verhave, J.P., Collins, W.E. and Mazier, D. (1988) Malaria sporozoite penetration. A new approach by double staining. *J Immunol Methods.* **112**: 201-205.

Robson, K.J., Hall, J.R., Jennings, M.W., Harris, T.J., Marsh, K., Newbold, C.I., *et al* (1988) A highly conserved amino-acid sequence in thrombospondin, properdin and in proteins from sporozoites and blood stages of a human malaria parasite. *Nature*. **335**: 79-82.

Robson, K.J., Frevert, U., Reckmann, I., Cowan, G., Beier, J., Scragg, I.G., *et al* (1995) Thrombospondin-related adhesive protein (TRAP) of *Plasmodium falciparum*: expression during sporozoite ontogeny and binding to human hepatocytes. *Embo J*. **14**: 3883-3894.

Roccasecca, R., Ansuini, H., Vitelli, A., Meola, A., Scarselli, E., Acali, S., *et al* (2003) Binding of the hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 is strain specific and is modulated by a complex interplay between hypervariable regions 1 and 2. *J Virol*. **77**: 1856-1867.

Rogers, W.O., Malik, A., Mellouk, S., Nakamura, K., Rogers, M.D., Szarfman, A., *et al* (1992) Characterization of *Plasmodium falciparum* sporozoite surface protein 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **89**: 9176-9180.

Rosenberg, R. and Rungsiwongse, J. (1991) The number of sporozoites produced by individual malaria oocysts. *Am J Trop Med Hyg*. **45**: 574-577.

Rosenberg, R., Wirtz, R.A., Schneider, I. and Burge, R. (1990) An estimation of the number of malaria sporozoites ejected by a feeding mosquito. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. **84**: 209-212.

Rottner, K., Stradal, T.E. and Wehland, J. (2005) Bacteria-host-cell interactions at the plasma membrane: stories on actin cytoskeleton subversion. *Dev Cell*. **9**: 3-17.

Rous, B.A., Reaves, B.J., Ihrke, G., Briggs, J.A., Gray, S.R., Stephens, D.J., *et al* (2002) Role of adaptor complex AP-3 in targeting wild-type and mutated CD63 to lysosomes. *Mol Biol Cell*. **13**: 1071-1082.

Rubinstein, E., Le Naour, F., Billard, M., Prenant, M. and Boucheix, C. (1994) CD9 antigen is an accessory subunit of the VLA integrin complexes. *Eur J Immunol*. **24**: 3005-3013.

Rubinstein, E., Le Naour, F., Lagaudriere-Gesbert, C., Billard, M., Conjeaud, H. and Boucheix, C. (1996) CD9, CD63, CD81, and CD82 are components of a surface tetraspan network connected to HLA-DR and VLA integrins. *Eur J Immunol*. **26**: 2657-2665.

Rubinstein, E., Ziyat, A., Prenant, M., Wrobel, E., Wolf, J.P., Levy, S., *et al* (In press) Infertility of female mice lacking CD81. *Dev Biol*.

Russell, D.G. and Sinden, R.E. (1981) The role of the cytoskeleton in the motility of coccidian sporozoites. *J Cell Sci*. **50**: 345-359.

Samuel, B.U., Mohandas, N., Harrison, T., McManus, H., Rosse, W., Reid, M. and Haldar, K. (2001) The role of cholesterol and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins of erythrocyte rafts in regulating raft protein content and malarial infection. *J Biol Chem*. **276**: 29319-29329.

Sam-Yellowe, T.Y. (1996) Rhoptry organelles of the apicomplexa: Their role in host cell invasion and intracellular survival. *Parasitol Today*. **12**: 308-316.

Sawada, S., Yoshimoto, M., Odintsova, E., Hotchin, N.A. and Berditchevski, F. (2003) The tetraspanin CD151 functions as a negative regulator in the adhesion-dependent activation of Ras. *J Biol Chem.* **278**: 26323-26326.

Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R.M., Acali, S., Filocamo, G., *et al* (2002) The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *Embo J.* **21**: 5017-5025.

Schmid, E., Zurbriggen, A., Gassen, U., Rima, B., ter Meulen, V. and Schneider-Schaulies, J. (2000) Antibodies to CD9, a tetraspan transmembrane protein, inhibit canine distemper virus-induced cell-cell fusion but not virus-cell fusion. *J Virol.* **74**: 7554-7561.

Schmidt, D.S., Klingbeil, P., Schnolzer, M. and Zoller, M. (2004) CD44 variant isoforms associate with tetraspanins and EpCAM. *Exp Cell Res.* **297**: 329-347.

Schofield, L. (2002) Antidisease vaccines. *Chem Immunol.* **80**: 322-342.

Schofield, L., Hewitt, M.C., Evans, K., Siomos, M.A. and Seeberger, P.H. (2002) Synthetic GPI as a candidate anti-toxic vaccine in a model of malaria. *Nature.* **418**: 785-789.

Schuler, H., Mueller, A.K. and Matuschewski, K. (2005) A Plasmodium Actin-depolymerizing Factor That Binds Exclusively to Actin Monomers. *Mol Biol Cell.* **16**: 4013-4023.

Schwartz-Albiez, R., Dorken, B., Hofmann, W. and Moldenhauer, G. (1988) The B cell-associated CD37 antigen (gp40-52). Structure and subcellular expression of an extensively glycosylated glycoprotein. *J Immunol.* **140**: 905-914.

Seehafer, J.G., Tang, S.C., Slupsky, J.R. and Shaw, A.R. (1988) The functional glycoprotein CD9 is variably acylated: localization of the variably acylated region to a membrane-associated peptide containing the binding site for the agonistic monoclonal antibody 50H.19. *Biochim Biophys Acta.* **957**: 399-410.

Seigneuret, M. (2006) Complete Predicted Three-Dimensional Structure of the Facilitator Transmembrane Protein and Hepatitis C Virus Receptor CD81: Conserved and Variable Structural Domains in the Tetraspanin Superfamily. *Biophys J.* **90**: 212-227.

Seigneuret, M., Delaguillaumie, A., Lagaudriere-Gesbert, C. and Conjeaud, H. (2001) Structure of the tetraspanin main extracellular domain. A partially conserved fold with a structurally variable domain insertion. *J Biol Chem.* **276**: 40055-40064.

Serru, V., Le Naour, F., Billard, M., Azorsa, D.O., Lanza, F., Boucheix, C. and Rubinstein, E. (1999) Selective tetraspan-integrin complexes (CD81/alpha4beta1, CD151/alpha3beta1, CD151/alpha6beta1) under conditions disrupting tetraspan interactions. *Biochem J.* **340** (Pt 1): 103-111.

Shakibaei, M. and Frevert, U. (1996) Dual interaction of the malaria circumsporozoite protein with the low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) and heparan sulfate proteoglycans. *J Exp Med.* **184**: 1699-1711.

Shaw, M.K. and Tilney, L.G. (1999) Induction of an acrosomal process in *Toxoplasma gondii*: visualization of actin filaments in a protozoan parasite. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **96**: 9095-9099.

Shaw, M.L., McLauchlan, J., Mills, P.R., Patel, A.H. and McCruden, E.A. (2003) Characterisation of the differences between hepatitis C virus genotype 3 and 1 glycoproteins. *J Med Virol*. **70**: 361-372.

Shi, W., Fan, H., Shum, L. and Derynck, R. (2000) The tetraspanin CD9 associates with transmembrane TGF- α and regulates TGF- α -induced EGF receptor activation and cell proliferation. *J Cell Biol*. **148**: 591-602.

Shin, S.C., Vanderberg, J.P. and Terzakis, J.A. (1982) Direct infection of hepatocytes by sporozoites of *Plasmodium berghei*. *J Protozool*. **29**: 448-454.

Shoham, T., Rajapaksa, R., Boucheix, C., Rubinstein, E., Poe, J.C., Tedder, T.F. and Levy, S. (2003) The tetraspanin CD81 regulates the expression of CD19 during B cell development in a postendoplasmic reticulum compartment. *J Immunol*. **171**: 4062-4072.

Sidjanski, S. and Vanderberg, J.P. (1997) Delayed migration of *Plasmodium* sporozoites from the mosquito bite site to the blood. *Am J Trop Med Hyg*. **57**: 426-429.

Sidjanski, S.P., Vanderberg, J.P. and Sinnis, P. (1997) *Anopheles stephensi* salivary glands bear receptors for region I of the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*. **90**: 33-41.

Silvie, O., Rubinstein, E., Boucheix, C. and Mazier, D. (2003a) [CD81: a tetraspanin implicated in *Plasmodium* infection]. *Med Sci (Paris)*. **19**: 169-171.

Silvie, O., Semblat, J.P., Franetich, J.F., Hannoun, L., Eling, W. and Mazier, D. (2002) Effects of irradiation on *Plasmodium falciparum* sporozoite hepatic development: implications for the design of pre-erythrocytic malaria vaccines. *Parasite Immunol*. **24**: 221-223.

Silvie, O., Rubinstein, E., Franetich, J.F., Prenant, M., Belnoue, E., Renia, L., *et al* (2003b) Hepatocyte CD81 is required for *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium yoelii* sporozoite infectivity. *Nat Med*. **9**: 93-96.

Silvie, O., Franetich, J.F., Charrin, S., Mueller, M.S., Siau, A., Bodescot, M., *et al* (2004) A role for apical membrane antigen 1 during invasion of hepatocytes by *Plasmodium falciparum* sporozoites. *J Biol Chem*. **279**: 9490-9496.

Simons, K. and Ehehalt, R. (2002) Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J Clin Invest*. **110**: 597-603.

Sinai, A.P. and Joiner, K.A. (1997) Safe haven: the cell biology of nonfusogenic pathogen vacuoles. *Annu Rev Microbiol*. **51**: 415-462.

Sincock, P.M., Fitter, S., Parton, R.G., Berndt, M.C., Gamble, J.R. and Ashman, L.K. (1999) PETA-3/CD151, a member of the transmembrane 4 superfamily, is localised to the plasma

membrane and endocytic system of endothelial cells, associates with multiple integrins and modulates cell function. *J Cell Sci.* **112** (Pt 6): 833-844.

Sinnis, P. and Sim, B.K. (1997) Cell invasion by the vertebrate stages of Plasmodium. *Trends Microbiol.* **5**: 52-58.

Sinnis, P. and Febbraio, M. (2002) Plasmodium yoelii sporozoites infect CD36-deficient mice. *Exp Parasitol.* **100**: 12-16.

Sinnis, P., Willnow, T.E., Briones, M.R., Herz, J. and Nussenzweig, V. (1996) Remnant lipoproteins inhibit malaria sporozoite invasion of hepatocytes. *J Exp Med.* **184**: 945-954.

Sinnis, P., Clavijo, P., Fenyo, D., Chait, B.T., Cerami, C. and Nussenzweig, V. (1994) Structural and functional properties of region II-plus of the malaria circumsporozoite protein. *J Exp Med.* **180**: 297-306.

Smith, J.E., Meis, J.F., Ponnudurai, T., Verhave, J.P. and Moshage, H.J. (1984) In-vitro culture of exoerythrocytic form of Plasmodium falciparum in adult human hepatocytes. *Lancet.* **2**: 757-758.

Spano, F., Putignani, L., Naitza, S., Puri, C., Wright, S. and Crisanti, A. (1998) Molecular cloning and expression analysis of a Cryptosporidium parvum gene encoding a new member of the thrombospondin family. *Mol Biochem Parasitol.* **92**: 147-162.

Speer, C.A., Wong, R.B., Blixt, J.A. and Schenkel, R.H. (1985) Capping of immune complexes by sporozoites of Eimeria tenella. *J Parasitol.* **71**: 33-42.

Srinivasan, P., Abraham, E.G., Ghosh, A.K., Valenzuela, J., Ribeiro, J.M., Dimopoulos, G., *et al* (2004) Analysis of the Plasmodium and Anopheles transcriptomes during oocyst differentiation. *J Biol Chem.* **279**: 5581-5587.

Sterk, L.M., Geuijen, C.A., van den Berg, J.G., Claessen, N., Weening, J.J. and Sonnenberg, A. (2002) Association of the tetraspanin CD151 with the laminin-binding integrins alpha3beta1, alpha6beta1, alpha6beta4 and alpha7beta1 in cells in culture and in vivo. *J Cell Sci.* **115**: 1161-1173.

Sterling, C.R., Aikawa, M. and Vanderberg, J.P. (1973) The passage of Plasmodium berghei sporozoites through the salivary glands of Anopheles stephensi: an electron microscope study. *J Parasitol.* **59**: 593-605.

Stewart, M.J. and Vanderberg, J.P. (1988) Malaria sporozoites leave behind trails of circumsporozoite protein during gliding motility. *J Protozool.* **35**: 389-393.

Stewart, M.J. and Vanderberg, J.P. (1991) Malaria sporozoites release circumsporozoite protein from their apical end and translocate it along their surface. *J Protozool.* **38**: 411-421.

Stewart, M.J., Nawrot, R.J., Schulman, S. and Vanderberg, J.P. (1986) Plasmodium berghei sporozoite invasion is blocked in vitro by sporozoite-immobilizing antibodies. *Infect Immun.* **51**: 859-864.

Stipp, C.S. and Hemler, M.E. (2000) Transmembrane-4-superfamily proteins CD151 and CD81 associate with alpha 3 beta 1 integrin, and selectively contribute to alpha 3 beta 1-dependent neurite outgrowth. *J Cell Sci.* **113** (Pt 11): 1871-1882.

Stipp, C.S., Orlicky, D. and Hemler, M.E. (2001a) FPRP, a major, highly stoichiometric, highly specific CD81- and CD9-associated protein. *J Biol Chem.* **276**: 4853-4862.

Stipp, C.S., Kolesnikova, T.V. and Hemler, M.E. (2001b) EWI-2 is a major CD9 and CD81 partner and member of a novel Ig protein subfamily. *J Biol Chem.* **276**: 40545-40554.

Stipp, C.S., Kolesnikova, T.V. and Hemler, M.E. (2003a) EWI-2 regulates alpha3beta1 integrin-dependent cell functions on laminin-5. *J Cell Biol.* **163**: 1167-1177.

Stipp, C.S., Kolesnikova, T.V. and Hemler, M.E. (2003b) Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends Biochem Sci.* **28**: 106-112.

Suhrbier, A., Winger, L.A., Castellano, E. and Sinden, R.E. (1990) Survival and antigenic profile of irradiated malarial sporozoites in infected liver cells. *Infect Immun.* **58**: 2834-2839.

Sultan, A.A., Briones, M.R., Gerwin, N., Carroll, M.C. and Nussenzweig, V. (1997a) Sporozoites of *Plasmodium yoelii* infect mice with targeted deletions in ICAM-1 and ICAM-2 or complement components C3 and C4. *Mol Biochem Parasitol.* **88**: 263-266.

Sultan, A.A., Thathy, V., Frevert, U., Robson, K.J., Crisanti, A., Nussenzweig, V., *et al* (1997b) TRAP is necessary for gliding motility and infectivity of plasmodium sporozoites. *Cell.* **90**: 511-522.

Suss-Toby, E., Zimmerberg, J. and Ward, G.E. (1996) Toxoplasma invasion: the parasitophorous vacuole is formed from host cell plasma membrane and pinches off via a fission pore. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**: 8413-8418.

Tachibana, I. and Hemler, M.E. (1999) Role of transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins CD9 and CD81 in muscle cell fusion and myotube maintenance. *J Cell Biol.* **146**: 893-904.

Takahashi, Y., Bigler, D., Ito, Y. and White, J.M. (2001) Sequence-specific interaction between the disintegrin domain of mouse ADAM 3 and murine eggs: role of beta1 integrin-associated proteins CD9, CD81, and CD98. *Mol Biol Cell.* **12**: 809-820.

Takeda, Y., Tachibana, I., Miyado, K., Kobayashi, M., Miyazaki, T., Funakoshi, T., *et al* (2003) Tetraspanins CD9 and CD81 function to prevent the fusion of mononuclear phagocytes. *J Cell Biol.* **161**: 945-956.

Tardieux, I., Baines, I., Mossakowska, M. and Ward, G.E. (1998a) Actin-binding proteins of invasive malaria parasites and the regulation of actin polymerization by a complex of 32/34-kDa proteins associated with heat shock protein 70kDa. *Mol Biochem Parasitol.* **93**: 295-308.

Tardieux, I., Liu, X., Poupel, O., Parzy, D., Dehoux, P. and Langsley, G. (1998b) A *Plasmodium falciparum* novel gene encoding a coronin-like protein which associates with actin filaments. *FEBS Lett.* **441**: 251-256.

Tardif, M.R. and Tremblay, M.J. (2005) Tetraspanin CD81 provides a costimulatory signal resulting in increased human immunodeficiency virus type 1 gene expression in primary CD4⁺ T lymphocytes through NF-kappaB, NFAT, and AP-1 transduction pathways. *J Virol.* **79**: 4316-4328.

Tarrant, J.M., Groom, J., Metcalf, D., Li, R., Borobokas, B., Wright, M.D., *et al* (2002) The absence of Tssc6, a member of the tetraspanin superfamily, does not affect lymphoid development but enhances in vitro T-cell proliferative responses. *Mol Cell Biol.* **22**: 5006-5018.

Templeton, T.J. and Kaslow, D.C. (1997) Cloning and cross-species comparison of the thrombospondin-related anonymous protein (TRAP) gene from *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium vivax* and *Plasmodium gallinaceum*. *Mol Biochem Parasitol.* **84**: 13-24.

Templeton, T.J., Kaslow, D.C. and Fidock, D.A. (2000) Developmental arrest of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* within the mosquito midgut via CTRP gene disruption. *Mol Microbiol.* **36**: 1-9.

Tewari, R., Spaccapelo, R., Bistoni, F., Holder, A.A. and Crisanti, A. (2002) Function of region I and II adhesive motifs of *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein in sporozoite motility and infectivity. *J Biol Chem.* **277**: 47613-47618.

Thathy, V., Fujioka, H., Gantt, S., Nussenzweig, R., Nussenzweig, V. and Menard, R. (2002) Levels of circumsporozoite protein in the *Plasmodium* oocyst determine sporozoite morphology. *Embo J.* **21**: 1586-1596.

Todres, E., Nardi, J.B. and Robertson, H.M. (2000) The tetraspanin superfamily in insects. *Insect Mol Biol.* **9**: 581-590.

Tomley, F.M. and Soldati, D.S. (2001) Mix and match modules: structure and function of microneme proteins in apicomplexan parasites. *Trends Parasitol.* **17**: 81-88.

Tomley, F.M., Clarke, L.E., Kawazoe, U., Dijkema, R. and Kok, J.J. (1991) Sequence of the gene encoding an immunodominant microneme protein of *Eimeria tenella*. *Mol Biochem Parasitol.* **49**: 277-288.

Touray, M.G., Warburg, A., Laughinghouse, A., Krettli, A.U. and Miller, L.H. (1992) Developmentally regulated infectivity of malaria sporozoites for mosquito salivary glands and the vertebrate host. *J Exp Med.* **175**: 1607-1612.

Trager, W. and Jensen, J.B. (1976) Human malaria parasites in continuous culture. *Science.* **193**: 673-675.

Triglia, T., Healer, J., Caruana, S.R., Hodder, A.N., Anders, R.F., Crabb, B.S. and Cowman, A.F. (2000) Apical membrane antigen 1 plays a central role in erythrocyte invasion by *Plasmodium* species. *Mol Microbiol.* **38**: 706-718.

Trottein, F., Triglia, T. and Cowman, A.F. (1995) Molecular cloning of a gene from *Plasmodium falciparum* that codes for a protein sharing motifs found in adhesive molecules from mammals and plasmodia. *Mol Biochem Parasitol.* **74**: 129-141.

Tseng, C.T. and Klimpel, G.R. (2002) Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J Exp Med.* **195**: 43-49.

Tsitsikov, E.N., Gutierrez-Ramos, J.C. and Geha, R.S. (1997) Impaired CD19 expression and signaling, enhanced antibody response to type II T independent antigen and reduction of B-1 cells in CD81-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**: 10844-10849.

van Dijk, M.R., Douradinha, B., Franke-Fayard, B., Heussler, V., van Dooren, M.W., van Schaijk, B., *et al* (2005) Genetically attenuated, P36p-deficient malarial sporozoites induce protective immunity and apoptosis of infected liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**: 12194-12199.

van Spriel, A.B., Puls, K.L., Sofi, M., Pouniotis, D., Hochrein, H., Orinska, Z., *et al* (2004) A regulatory role for CD37 in T cell proliferation. *J Immunol.* **172**: 2953-2961.

Vanderberg, J.P. (1974) Studies on the motility of Plasmodium sporozoites. *J Protozool.* **21**: 527-537.

Vanderberg, J.P. (1975) Development of infectivity by the Plasmodium berghei sporozoite. *J Parasitol.* **61**: 43-50.

Vanderberg, J.P. and Frevert, U. (2004) Intravital microscopy demonstrating antibody-mediated immobilisation of Plasmodium berghei sporozoites injected into skin by mosquitoes. *Int J Parasitol.* **34**: 991-996.

Vanderberg, J.P., Chew, S. and Stewart, M.J. (1990) Plasmodium sporozoite interactions with macrophages in vitro: a videomicroscopic analysis. *J Protozool.* **37**: 528-536.

Vaughan, J.A., Noden, B.H. and Beier, J.C. (1992) Population dynamics of Plasmodium falciparum sporogony in laboratory-infected Anopheles gambiae. *J Parasitol.* **78**: 716-724.

Veneault-Fourrey, C., Parisot, D., Gourgues, M., Lauge, R., Lebrun, M.H. and Langin, T. (2005) The tetraspanin gene CIPLS1 is essential for appressorium-mediated penetration of the fungal pathogen Colletotrichum lindemuthianum. *Fungal Genet Biol.* **42**: 306-318.

Voisset, C. and Dubuisson, J. (2004) Functional hepatitis C virus envelope glycoproteins. *Biol Cell.* **96**: 413-420.

Voisset, C., Callens, N., Blanchard, E., Op De Beeck, A., Dubuisson, J. and Vu-Dac, N. (2005) High density lipoproteins facilitate hepatitis C virus entry through the scavenger receptor class B type I. *J Biol Chem.* **280**: 7793-7799.

von Lindern, J.J., Rojo, D., Grovit-Ferbas, K., Yeramian, C., Deng, C., Herbein, G., *et al* (2003) Potential role for CD63 in CCR5-mediated human immunodeficiency virus type 1 infection of macrophages. *J Virol.* **77**: 3624-3633.

Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., *et al* (2005) Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med.* **11**: 791-796.

- Wan, K.L., Carruthers, V.B., Sibley, L.D. and Ajioka, J.W. (1997) Molecular characterisation of an expressed sequence tag locus of *Toxoplasma gondii* encoding the micronemal protein MIC2. *Mol Biochem Parasitol.* **84**: 203-214.
- Wang, Q., Fujioka, H. and Nussenzweig, V. (2005) Mutational analysis of the GPI-anchor addition sequence from the circumsporozoite protein of *Plasmodium*. *Cell Microbiol.* **7**: 1616-1626.
- Warburg, A. and Miller, L.H. (1992) Sporogonic development of a malaria parasite in vitro. *Science.* **255**: 448-450.
- Warburg, A. and Schneider, I. (1993) In vitro culture of the mosquito stages of *Plasmodium falciparum*. *Exp Parasitol.* **76**: 121-126.
- Warburg, A., Touray, M., Krettli, A.U. and Miller, L.H. (1992) *Plasmodium gallinaceum*: antibodies to circumsporozoite protein prevent sporozoites from invading the salivary glands of *Aedes aegypti*. *Exp Parasitol.* **75**: 303-307.
- Waterhouse, R., Ha, C. and Dveksler, G.S. (2002) Murine CD9 is the receptor for pregnancy-specific glycoprotein 17. *J Exp Med.* **195**: 277-282.
- Wengelnik, K., Spaccapelo, R., Naitza, S., Robson, K.J., Janse, C.J., Bistoni, F., *et al* (1999) The A-domain and the thrombospondin-related motif of *Plasmodium falciparum* TRAP are implicated in the invasion process of mosquito salivary glands. *Embo J.* **18**: 5195-5204.
- Wetzel, D.M., Hakansson, S., Hu, K., Roos, D. and Sibley, L.D. (2003) Actin filament polymerization regulates gliding motility by apicomplexan parasites. *Mol Biol Cell.* **14**: 396-406.
- Whittaker, C.A. and Hynes, R.O. (2002) Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Mol Biol Cell.* **13**: 3369-3387.
- Willett, B., Hosie, M., Shaw, A. and Neil, J. (1997) Inhibition of feline immunodeficiency virus infection by CD9 antibody operates after virus entry and is independent of virus tropism. *J Gen Virol.* **78 (Pt 3)**: 611-618.
- Willett, B.J., Hosie, M.J., Jarrett, O. and Neil, J.C. (1994) Identification of a putative cellular receptor for feline immunodeficiency virus as the feline homologue of CD9. *Immunology.* **81**: 228-233.
- Wright, M.D., Rochelle, J.M., Tomlinson, M.G., Seldin, M.F. and Williams, A.F. (1993) Gene structure, chromosomal localization, and protein sequence of mouse CD53 (Cd53): evidence that the transmembrane 4 superfamily arose by gene duplication. *Int Immunol.* **5**: 209-216.
- Wright, M.D., Geary, S.M., Fitter, S., Moseley, G.W., Lau, L.M., Sheng, K.C., *et al* (2004) Characterization of mice lacking the tetraspanin superfamily member CD151. *Mol Cell Biol.* **24**: 5978-5988.

Yan, Y., Shirakabe, K. and Werb, Z. (2002) The metalloprotease Kuzbanian (ADAM10) mediates the transactivation of EGF receptor by G protein-coupled receptors. *J Cell Biol.* **158**: 221-226.

Yanez-Mo, M., Alfranca, A., Cabanas, C., Marazuela, M., Tejedor, R., Ursa, M.A., *et al* (1998) Regulation of endothelial cell motility by complexes of tetraspan molecules CD81/TAPA-1 and CD151/PETA-3 with alpha3 beta1 integrin localized at endothelial lateral junctions. *J Cell Biol.* **141**: 791-804.

Yang, X., Kovalenko, O.V., Tang, W., Claas, C., Stipp, C.S. and Hemler, M.E. (2004) Palmitoylation supports assembly and function of integrin-tetraspanin complexes. *J Cell Biol.* **167**: 1231-1240.

Yang, X., Claas, C., Kraeft, S.K., Chen, L.B., Wang, Z., Kreidberg, J.A. and Hemler, M.E. (2002) Palmitoylation of tetraspanin proteins: modulation of CD151 lateral interactions, subcellular distribution, and integrin-dependent cell morphology. *Mol Biol Cell.* **13**: 767-781.

Yauch, R.L., Berditchevski, F., Harler, M.B., Reichner, J. and Hemler, M.E. (1998) Highly stoichiometric, stable, and specific association of integrin alpha3beta1 with CD151 provides a major link to phosphatidylinositol 4-kinase, and may regulate cell migration. *Mol Biol Cell.* **9**: 2751-2765.

Yauch, R.L., Kazarov, A.R., Desai, B., Lee, R.T. and Hemler, M.E. (2000) Direct extracellular contact between integrin alpha(3)beta(1) and TM4SF protein CD151. *J Biol Chem.* **275**: 9230-9238.

Ying, P., Shakibaei, M., Patankar, M.S., Clavijo, P., Beavis, R.C., Clark, G.F. and Frevert, U. (1997) The malaria circumsporozoite protein: interaction of the conserved regions I and II-plus with heparin-like oligosaccharides in heparan sulfate. *Exp Parasitol.* **85**: 168-182.

Yoshida, N., Potocnjak, P., Nussenzweig, V. and Nussenzweig, R.S. (1981) Biosynthesis of Pb44, the protective antigen of sporozoites of *Plasmodium berghei*. *J Exp Med.* **154**: 1225-1236.

Yuda, M., Sakaida, H. and Chinzei, Y. (1999) Targeted disruption of the *plasmodium berghei* CTRP gene reveals its essential role in malaria infection of the vector mosquito. *J Exp Med.* **190**: 1711-1716.

Zapata, J.C., Perlaza, B.L., Hurtado, S., Quintero, G.E., Jurado, D., Gonzalez, I., *et al* (2002) Reproducible infection of intact *Aotus lemurinus griseimembra* monkeys by *Plasmodium falciparum* sporozoite inoculation. *J Parasitol.* **88**: 723-729.

Zemni, R., Bienvenu, T., Vinet, M.C., Sefiani, A., Carrie, A., Billuart, P., *et al* (2000) A new gene involved in X-linked mental retardation identified by analysis of an X;2 balanced translocation. *Nat Genet.* **24**: 167-170.

Zhang, J., Randall, G., Higginbottom, A., Monk, P., Rice, C.M. and McKeating, J.A. (2004) CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. *J Virol.* **78**: 1448-1455.

Zhang, X.A., Bontrager, A.L. and Hemler, M.E. (2001) Transmembrane-4 superfamily proteins associate with activated protein kinase C (PKC) and link PKC to specific beta(1) integrins. *J Biol Chem.* **276**: 25005-25013.

Zhang, X.A., Kazarov, A.R., Yang, X., Bontrager, A.L., Stipp, C.S. and Hemler, M.E. (2002) Function of the tetraspanin CD151-alpha6beta1 integrin complex during cellular morphogenesis. *Mol Biol Cell.* **13**: 1-11.

Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D.R., *et al* (2005) Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102**: 9294-9299.

Zhu, G.Z., Miller, B.J., Boucheix, C., Rubinstein, E., Liu, C.C., Hynes, R.O., *et al* (2002) Residues SFQ (173-175) in the large extracellular loop of CD9 are required for gamete fusion. *Development.* **129**: 1995-2002.

Zieler, H. and Dvorak, J.A. (2000) Invasion in vitro of mosquito midgut cells by the malaria parasite proceeds by a conserved mechanism and results in death of the invaded midgut cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **97**: 11516-11521.